

Aus der Nordwestdeutschen Kieferklinik
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Rainer Schmelzle)
des Universitätskrankenhauses Eppendorf

Zellkultur-Untersuchungen zur Beeinflussung des Wachstums
von Sarkomzelllinien durch humanes rekombinantes Erythropoietin,
Prostaglandinderivate und Androgene im Monolayer-Proliferations-
Assay

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt

von

Peter Mestmacher
aus Uelzen

Hamburg, 1996

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. Dr. H.- P. Leichtweiß

Referent: priv. Doz. Dr. Dr. R. E. Friedrich

Korreferent: Prof. Dr. Dr. R. Schmelzle

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	4
<u>2</u>	<u>Material und Methoden</u>	12
2.1	<u>Zelllinien</u>	12
2.2	<u>Materialgewinnung</u>	13
2.3	<u>Zellkultivierung</u>	14
2.4	<u>Passagierung der Kulturen</u>	15
2.5	<u>Rekultivierung der Proben</u>	16
2.6	<u>Dekontamination von Zellkulturen</u>	16
2.7	<u>Testverfahren</u>	17
2.8	<u>Wachstumskurven</u>	20
2.9	<u>Verdünnungsreihen</u>	20
2.10	<u>Übersicht der angewandten Konzentrationen</u>	31
<u>3</u>	<u>Ergebnisse</u>	34
3.1	<u>ERYTHROPOIETIN</u>	34
3.2	<u>ANDROGENE</u>	41
3.3	<u>PROSTAGLANDINE</u>	49
<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	54
4.1	<u>ERYTHROPOIETIN</u>	54
4.2	<u>PROSTAGLANDINE</u>	55
4.3	<u>ANDROGENE</u>	57
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung</u>	59
<u>6</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	61
<u>7</u>	<u>Anhang</u>	70
<u>8</u>	<u>Danksagung</u>	87
<u>9</u>	<u>Lebenslauf</u>	88
<u>10</u>	<u>Erklärung</u>	89

1 Einleitung

Die Arzneimittelsicherheit ist eine der zentralen Fragestellungen bei der Anwendung von pharmakologisch wirksamen Substanzen am Menschen. Um diese zu prüfen, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung.

Der Tierversuch ist hier eine oft angewandte Methode. Dabei stellt aber die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ein Problem dar. Die Übereinstimmung der Resultate wird umso größer sein, je größer die phylogenetische Verwandtschaft des Versuchstiers ist. Diese ist bei den Primaten gegeben, deren verfügbare Anzahl aber nicht ausreicht, um hinreichend viele Versuche durchzuführen. Bei geringerer Verwandtschaft zwischen der Species und dem Menschen wird die klinische Übertragbarkeit schwieriger. Neben den Kosten stellt sich beim Tierexperiment die Frage nach der moralischen Vertretbarkeit von Versuchen am lebenden Objekt. Versuche direkt am Menschen verbieten sich meist aus gleichem Grunde, es sei denn, es handelt sich um pharmakologische Fragen, die sich nur am intakten Organismus oder Organ prüfen lassen.

Mit der Entdeckung der Zellkultur - der Etablierung von Zellen in einer Nährlösung - zu Anfang dieses Jahrhunderts (BEEBE und EWING, 1906) wurde die Möglichkeit geschaffen, Zellmaterial in nahezu unbegrenztem Umfang für Experimente zur Verfügung zu stellen. Die meist operativ gewonnenen Primärgewebe können- in ihre Einzelzellen dissoziiert - über einen beliebig langen Zeitraum in der Kultur gehalten werden. So sind sowohl patientenorientierte Testreihen als auch Experimente der Grundlagenforschung möglich.

(ARPS, 1988)

Bei der Behandlung von Patienten ist wegen der häufig auftretenden Multimorbidität eine vielfache medikamentöse Therapie notwendig. Mit modernen Untersuchungsverfahren kann vor Anwendung einer Substanz beim Menschen die Arzneimittelsicherheit in-vitro geprüft werden. Insbesondere für Tumorkranken sind derartige in-vitro Untersuchungen wertvoll. Hier zeigt der Monolayer-Proliferationsassay eine gute klinische Übertragbarkeit (ARPS, 1988). Hierbei lässt sich die Dosis-Wirkungs-Beziehung genauer prüfen als z.B. im Tierversuch, da beim Proliferationsassay die zu untersuchenden Substanzen auf eine genau definierte Menge reaktiver organischer Masse (hier z.B. Sarkomzellen) einwirken. Nach dem Anzüchten und dem Aussäen einer genauen Zellzahl werden hierbei die Substanzen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und die Reaktionen der Zellen durch Auszählung ihrer Gesamtzahl nach bestimmten Zeiträumen ermittelt. Die Konzentrationen der zu testenden Substanzen werden durch Umrechnung der empfohlenen Therapiedosen (hier: Erythropoietin und Prostaglandine) oder des Blutserumspiegels (hier: Androgene) auf das ausgesäte Zellvolumen ermittelt (ARPS, 1988 und MATERIAL UND METHODEN).

Die klinische Problematik der Therapie von Tumorkranken zeigt sich beispielsweise bei der Behandlung der Tumoranämie, die sowohl durch den Tumor selbst (paraneoplastisches Syndrom) als auch durch bestimmte Therapieformen (z.B. Zytostatikatherapie) hervorgerufen werden kann. Die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten oder anderen Blutbestandteilen ist hier häufig das Mittel der Wahl, wenngleich auch aufgrund möglicher akuter

Nebeneffekte nicht völlig risikolos (MILLER, 1991). Trotz einer hochentwickelten Transfusionsmedizin besteht aber bei Transfusionen außer der Möglichkeit der Manifestation einer progredienten Hämosiderose immer noch das Risiko der Infektion mit Hepatitis- bzw. HIV- Erregern, was gerade in der jüngeren Vergangenheit zu einer nicht unbeträchtlichen Verunsicherung der Patienten geführt hat (SCHAEFER und HEIDLAND, 1992).

Bei der Behandlung der renalen Anämie terminal niereninsuffizienter Patienten konnte in den letzten Jahren das rekombinante humane Erythropoietin einen wesentlichen Fortschritt bringen (SCIGALLA et al., 1992). Die Übertragung dieser Ergebnisse auf Patienten mit einer manifesten Tumoranämie kann aber nur unter Vorbehalt, d.h. nicht ohne geeignete Studien geschehen, da hier eine weitere Variable - der Tumor - zu beachten ist. So sollte bei Patienten mit soliden malignen Tumoren, z.B. Sarkomen, immer kontrolliert werden, ob eine angewendete Substanz eine tumorproliferative Wirkung zeigt und wenn ja, in welchem Umfang. Dies ist eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit. Es läßt sich daraufhin prätherapeutisch genau absehen, ob die Anwendung einer bestimmten Substanz bei einem bestimmten Patienten zu vertreten ist oder das Risiko bzw. der Faktor der Tumorproliferation in keinem Verhältnis zu dem zu erwartenden Nutzen für den Patienten steht. Die Androgene, genauer Testosteron und zwei seiner Derivate sind die zweite Substanzgruppe, die in dieser Untersuchung auf ihre tumorproliferative Wirkung in Bezug auf Sarkome getestet wurden. Die Androgene zeigen eine additive Wirkung zu Erythropoietin in Zusammenhang mit der Erythropoese (AMMON, 1987). Desweiteren ist die Anwendung dieser Steroide für die klinische

Behandlung bestimmter Tumoranämieformen bekannt (FACON, 1991; KOJIMA, 1992). Weiterhin wurde in verschiedenen Untersuchungen sowohl ein stimulierender (NISHI, 1992) als auch ein inhibierender Effekt

(HACKENBERG, 1990) von Androgenen auf das Tumorzellwachstum nachgewiesen. Aus diesem Grunde erfolgte eine parallele Prüfung im Assay.

Als dritte Substanzgruppe wurden Prostaglandinderivate (PGI_2 und PGE_1) auf ihre tumorzellproliferativen Effekt getestet. Als Abkömmlinge der Arachidonsäure werden diese hauptsächlich zur intraarteriellen Infusion bei arteriellen Verschlusskrankheiten verwendet (GRUß, 1984 und HEIDRICH, 1988). Ebenfalls finden sie in der experimentellen Mikrogefäßchirurgie Anwendung (BOUSSER, 1972 und ZIMMERMANN, 1988). Da sie eventuell in der Rekonstruktionschirurgie nach Tumorresektionen genutzt werden, erschien auch hier die Überprüfung auf eine eventuelle tumorstimulierende Wirkung notwendig.

Chemie und Pharmakologie

1. Erythropoietin

Das zum überwiegenden Teil (80 %) in der Niere gebildete Hormon Erythropoietin (Abb. 1) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 34000 Dalton, dessen pharmakodynamische Wirkung an die Sequenz von 166 Aminosäuren geknüpft ist (BALDUS und BRASS, 1992). In physiologischen Konzentrationen steigert es die mitotische Aktivität der Vorläuferzellen der Erythrozyten, den "colony forming units - erythroid" (CFU-E) sowie den Proerythroblasten. Die Ausbildung von Megakaryozyten, den

Vorläuferzellen der Thrombozyten, aus den "colony forming units - Megacaryozyt" (CFU-Meg) unterliegt ebenfalls dem regulatorischen Einfluß des Erythropoietin

(CLARK und KARMEN, 1987).

Die normale Serum-EPO-Konzentration liegt bei 15-30 U/l (OSTER, 1991). Diese Konzentration kann erhöht sein, was bei einer Gewebshypoxie (PLATANIAS, 1991) der Fall ist oder auch erniedrigt sein, z.B. bei einer Zystenniere oder einem Nierenadenom. Letzteres zeigt die Anwendbarkeit des Erythropoietins als Tumormarker.

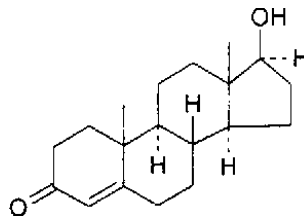
Seit im Jahre 1985 die Aminosäuresequenz des Erythropoietins entdeckt wurde (LIN et al., 1985), war es möglich, auf gentechnologischem Wege rekombinantes humanes Erythropoietin (r-HuEPO) herzustellen. Nach Untersuchungen von WIECZOREK et al. (1992) ist die Aminosäurezusammensetzung der verschiedenen Chargen r-HuEPO vergleichbar dem aus Urin isolierten WHO-Standard. EGRIE wies 1986 nach, daß das rekombinante Erythropoietin dem natürlichen Hormon in seiner biologischen Aktivität gleicht. In Voruntersuchungen an Karzinomzellen hat sich kein toxischer oder therapeutisch nutzbarer Effekt des r-HuEPO nachweisen lassen (FRIEDRICH, 1994).

2. Androgene

Das natürliche Androgen ist das Testosteron (Abb.2). Es wird in den Leydigischen Zwischenzellen des Hodengewebes aus dem aus Cholesterin entstandenen Pregnenolon gebildet (WELLHÖNER, 1988). Dies kann entweder über die Bildung von Progesteron oder Epiandrosteron geschehen. Die Nebennierenrinde ist ebenfalls in der Lage, Androgene zu bilden. Das dabei entstehende Dehydro-

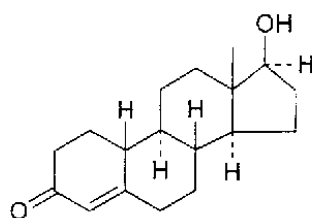
epiandrosteron wird in den Testes als Testosteronvorläufer verwendet. Nach WELLHÖNER sind die Hauptwirkungen des nach der Pubertät therapeutisch eingesetzten Testosterons unter anderem:

- Förderung des Eiweißanbaus
- Förderung des Einbaus von Calcium und Phosphat in das Skelettsystem
- Förderung der Retention von Na^+ , K^+ und Wasser
- Förderung des Wachstums beim Prostatakarzinom
- Hemmung bestimmter Formen von Mamma- und Uteruskarzinomen

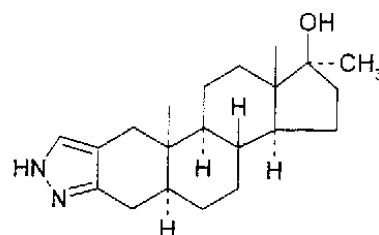


Testosteron Abb. 2

Nandralon (Abb. 3) und Stanozolol (Abb. 4) sind Derivate des Testosterons.



Nandralon Abb. 3



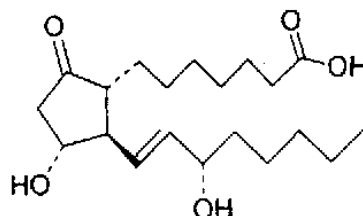
Stanozol Abb. 4

Neben den androgenen und anabolen Wirkungen verstärken alle Androgene die Erythropoese (AMMON, 1987). Dieses wird in einer Untersuchung von WEBER (1991) bestätigt. Die Plasmakonzentration von Testosteron beträgt 4-10 ng/ml (KRAUSE, 1985).

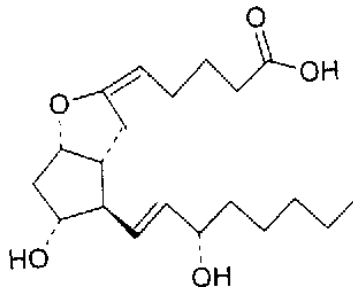
3. Prostaglandine

Prostaglandine sind wie Thromboxane und Leukotriene Abkömmlinge mehrfach ungesättigter Fettsäuren, speziell der Arachidonsäure und spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungs- und Überempfindlichkeitsprozessen (LÖFFLER und WEISS, 1988). Die Prostaglandine werden unter Verwendung zelleigener Membranphospholipide von den meisten Zellarten selbst synthetisiert, entweder wie in der Lunge und im Gefäßendothel kontinuierlich oder auf einen äußeren Reiz hin (WELFHÖNER, 1988). Hauptwirkungen einzelner Prostaglandine sind eine Aggregationshemmung der Thrombozyten sowie eine Gefäßdilataion. Prostaglandine sind echte primäre Botenstoffe, die vorwiegend lokal wirken.

Für die Testreihen wurden hier Prostaglandin E₁ (PGE₁, Abb. 5) und Prostaglandin I₂ (PGI₂, Abb. 6)



Prostaglandin E₁ Abb. 5



Prostaglandin I2 Abb. 6

Fragestellung

Ziel dieser Untersuchung ist es, eine Beeinflussung des Wachstumsverhaltens von Sarkomzelllinien durch die drei angewandten Substanzgruppen zu eruieren. Bei einer tumorproliferativen Wirkung sollte die Größe ermittelt werden, um die Folgen für den Patienten zu klären. Eine mäßige Stimulation kann hier noch vertretbar sein, wenn der Nutzen der Substanz überwiegt.

Bei einer Hemmung des Wachstums muß geklärt werden, ob diese in einem therapeutischen Rahmen liegt, in dem keine zytotoxischen Effekte zu erwarten sind.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Die Versuche wurden an 10 (8) Primärtumoren durchgeführt, die aus zuvor aufbereitetem Gewebematerial kultiviert worden waren. Hierbei handelte es sich um Tumore verschiedener mesenchymaler Herkunft (siehe Tab.1). Die den Zellkulturen zugrundeliegenden Gewebeproben wurden dem Pathologischen Institut der Universität Hamburg von verschiedenen Kliniken konsiliarisch zur Chemosensitivitätstestung im Monolayer-Proliferationsassay übersandt. Dabei handelte es sich ausschließlich um OP-Präparate, die nach der ersten Testung im Proliferationsassay tiefgefroren wurden. Zur Durchführung der Versuche mußten die Tumore wieder rekultiviert werden.

TAB.1 Zelllinienart und Nummer

EPS 87/015	malignes fibröses Histiozytom
EPS 86/102	malignes fibröses Histiozytom
EPS 89/148	Rhabdomyosarkom
EPS 87/266	Rhabdomyosarkom
EPS 89/063	malignes Schwannom
EPS 86/324	malignes Schwannom
EPS 87/214	Liposarkom
EPS 86/197	Liposarkom
EPS 87/072	Fibrosarkom
EPS 89/096	Fibrosarkom

2.2 Materialgewinnung

Ausgangsmaterial der Untersuchungen bildete ursprünglich solides Gewebe. Das Präparat wurde steril entnommen und möglichst frisch weiterverarbeitet. Das Gewebe wurde in Stücken von ca. 0,3 cm Kantenlänge bei Raumtemperatur in Transportmedium eingebracht. Die möglichst schonende und vollständige Dissoziation war bei der Aufbereitung der Präparate ein wichtiger Faktor, weil dadurch eine größere Ausbeute an vitalen Zellen zu erwarten war. Da zellreiche Primärtumore besser wachsen als zellarme und ebenfalls eine höhere Anwachsrate haben (ARPS 1988), ist eine möglichst hohe Ausbeute anzustreben. Das vorbereitete Gewebe wird vorsichtig mechanisch zerkleinert. Hat dies noch nicht zu einer genügenden Auftrennung geführt, wird eine zusätzliche enzymatische Aufbereitung notwendig. Hierfür geeignete Enzyme sind z.B. Trypsin, Dispase, Kollagenase oder Kombinationen daraus (ARPS 1988). Die enzymatische Auftrennung der in den Versuchsreihen verwendeten Kulturen geschah mit einer Mischung aus 0,1 U Kollagenase mit 0,8 U Dispase/ml.

Die mit dieser Methode erhaltenen Zellsuspensionen werden in 75 ccm Kulturflaschen (Fa. Nunc, Dänemark) mit 20 ml Kulturmedium ausgesät.

2.3 Zellkultivierung

Bei der Kultivierung von Zellen sollte die in-vivo Situation möglichst getreu dargestellt werden. Als wichtigste Parameter dienen hierfür: pH, Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Osmolarität.

Als Inkubationsmedium für die Tumorzellkulturen diente Leibowitz L-15 Medium, dem folgende Zusätze zugesetzt wurden (bezogen auf 500 ml Grundmedium): 50 ml fötales Kälberserum; 0,5 mg Glutamin; 3,1 mg Fetuin; 1,25 mg Transferrin; 0,56 g Natriumhydrogencarbonat; 40 IE Insulin; 50 ml MEM Vitamine sowie 250 mg Glukose.

Die Inkubationstemperatur lag analog der Körpertemperatur des Menschen bei 37° C (Inkubator: Stericult, Fa. Labotec, Göttingen). Um einer Verschiebung der Konzentrationen und der Osmolarität durch Verdunsten von Medium aus den Kulturflaschen entgegenzuwirken, mußten die Brutschränke eine 95 %ige Luftfeuchtigkeit aufweisen. Die Begasung der Schränke erfolgte mit atmosphärischer Luft incl. 5% CO₂. Dieses Gasgemisch stellte den O₂-Bedarf der Zellen sicher. Das Kohlendioxid bildet den Säureanteil eines Puffers, dessen korrespondierende Base im Medium mit Natriumbicarbonat gegeben war. Die Osmolarität des Mediums war mit einer engen Grenze der natürlichen von 290 mOsmol/l angeglichen.

Das Kulturmedium in den Flaschen war nach durchschnittlich 2-3 Tagen - abhängig vom Wachstum der jeweiligen Tumorzelllinie - aufgebraucht und mußte ausgetauscht werden. Dies wird optisch durch einen Indikator im Medium (Phenolrot) angezeigt (Umschlag nach gelb bei pH 6,4 - 6,8). Hierzu wurde das

verbrauchte Medium entfernt. Nach dem Spülen der Flaschen mit 5 ml PBS wurden 20 ml frisches Medium in die Kulturflaschen pipettiert. Alle Manipulationen an den Zelllinien wie z.B. der Mediumwechsel oder die Passagierung wurden unter einer sterilen Werkbank (Bench) durchgeführt, um die Gefahr der Kontamination der Kulturen durch Mikroorganismen zu verringern.

2.4 Passagierung der Kulturen

Um den in-vitro wachsenden Monolayer über einen längeren Zeitraum zu halten, oder auch um die Zellen einzufrieren oder zu ernten, ist eine Passagierung der Kulturen in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit notwendig. Dazu wurden nach Entfernen des Kulturmediums die Zellen 10-15 Minuten mit einer 0,05 % Trypsinlösung in 0,05 % Kalzium-freiem EDTA überschichtet. Dies führt zu einer Ablösung des Zellrasens vom Boden der Kulturflasche sowie zu einer Lösung der Interzellularverbindungen. Die nun vorliegende Einzelzellsuspension konnte jetzt - unter Zugabe von Medium - in einer definierten Zellzahl ausgesät oder eingefroren werden. Dies geschah, indem die Zellen zunächst 5 min. bei 1000 U/min zentrifugiert wurden, danach in 1 ml einer Lösung aus 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) in Kulturmedium überführt, bei 18° C einige Stunden vorgekühlt wurden, um dann bei -80° C tiefgefroren zu werden. Als Gefäß dienten jeweils Kyroröhrchen mit Schraubstopfen (2 ml Inhalt) der Fa. Nunc, Dänemark. Alle untersuchten Zellkulturen der Primärtumoren wurden aus bereits

tiefgefrorenen Proben rekultiviert und lagen zum Versuchszeitpunkt in verschiedenen Passagen vor.

2.5 Rekultivierung der Proben

Die tiefgefrorenen Zellsuspensionen wurden bei Raumtemperatur vorsichtig aufgetaut und in ein steriles 10 ml Reagensglas mit Kulturmedium überführt. Nun wurde bei 1000 U/min 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, das entstandene Zellpallet mit frischem Kulturmedium aufgenommen und in einer 75 ccm Kulturflasche mit 20 ml Medium ausgesät.

2.6 Dekontamination von Zellkulturen

Die Kontamination durch Mikroorganismen ist ein Problem der Primär- und Langzeitkultur. Bei primär sterilen Kulturen kann dies entstehen durch:

- a. Unachtsamkeit bei der Handhabung
- b. Kontamination von Medien
- c. Sprunginfektion aus bereits kontaminierten Kulturen, die im gleichen Brutschrank lagern.

Zu beachten ist, daß es bei der in-vitro-Dekontamination der Infektionen mit Antibiotika bzw. Antimykotika u.U. zu zytotoxischen Effekten auf die kultivierten Zellen kommen kann, die den Versuch verfälschen bzw. unmöglich machen.

So stellt sich bei Kulturen, die nur unter dauerender Zugabe von Antibiotika bzw. Antimykotika wachsen die Frage, ob ein beobachteter Effekt im Proliferationsassay durch die zu untersuchende Substanz, das Antibiotikum oder durch eine Wechselwirkung Substanz / Antibiotikum hervorgerufen wurde.

Trat bei den hier untersuchten Zelllinien eine Kontamination auf (n=4 Fälle), wurde wie folgt verfahren:

a. Bakterielle Kontamination (n=3 Fälle)

3-tägige Behandlung mit einer Kombination aus Penicillin/
Streptomycin (100 µg/ml Medium) und Neomycin/Bactracin
(10 µg/ml Medium)

Beobachten der Kultur auf Reinfektion und ggf. erneute
Behandlung

b. Vermutete Infektion durch Mycoplasmen (n=1

Fall) Behandlung der Kultur mit Mycoplasma removal agent
(MRA, Fa. Dainippon Co. & ICN Biomedicals, England)

2.7 Testverfahren

Die Grundlage der Substanztestungen bildete der Monolayer-Proliferationsassay (DIETEL et al. 1987, ARPS 1988). Die Aussaat der Zellen erfolgte in 12# Cluster-Petrischalen (DIETEL 1987, ARPS 1988). Das Vorgehen war wie folgt:

Zunächst wurden die Zellen der zu testenden Linie trypsinisiert, um sie vom Boden der Kulturflaschen zu lösen (siehe 2.4.). Die abgelösten Zellen wurden in ein mit Kulturmedium gefülltes Reagenzglas überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl pro ml der so entstandenen Zellsuspension konnte nun die Aussaat einer definierten Anzahl von Sarkomzellen (meist 5000-10000 pro Napf des Clusters, abhängig von der jeweiligen Wachstums-
geschwindigkeit der Zelllinie) erfolgen. Die Cluster wurden 1-3 Tage unter den in 2.3. beschriebenen Inkubationsbedingungen gehalten, um ihnen das Absetzen auf dem Schalenboden und das Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase zu

ermöglichen. Am Tag 0 der Testung wurden die zu untersuchenden Substanzen in den festgelegten Konzentrationen (K3-K1 Erythropoietin, 10xK3-K1 Androgene, K3-3xK0,1 Prostaglandinderivate), gelöst in 1 ml Medium, zugegeben. Der Test erfolgte jeweils in 3 parallelen Ansätzen (ARPS, 1988). Bei allen drei Substanzgruppen wurde sowohl am Tag 1 als auch am Tag 2 der Testung ein Mediumwechsel/Substanzwechsel durchgeführt. Am Tag 3 wurden die Zellen trypsinisiert und die Zahl der lebenden Zellen unter Einwirkung der verschiedenen Substanzkonzentrationen mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ermittelt (Mikroskop: Phasenkontrastmikroskop, Fa. Olympus).

Pro Zelllinie wurden am Tag 0 und Tag 3 jeweils aus sechs unbehandelten Clustern die Zellzahl ausgezählt. Diese Werte stellten den Ausgangskontrollwert ZZ prae und den Endkontrollwert ZZ post der unbehandelten Kontrollkulturen dar. Zu beachten ist hier, daß bei Substanzen, die eines speziellen Lösungsmittels bedürfen (siehe Androgene), eine zusätzliche ZZ post-Kontrolle notwendig wird. In dieser Kontrolle wird den Sarkomzellen das reine Lösungsmittel in der am höchsten vorkommenden Konzentration hinzugefügt. So konnte ausgeschlossen werden, daß ein durch das Lösungsmittel verursachter Effekt als Substanzwirkung fehlgedeutet wird. Liegt nämlich der Wert der unbehandelten ZZ post-Kontrolle in der gleichen Größenordnung der behandelten ZZ post-Kontrolle, konnte davon ausgegangen werden, daß das Lösungsmittel keine Wirkung auf die Zelllinien ausübt.

Die Wirksamkeit der untersuchten Substanzen konnte an der relativen Wachstumsveränderung gemessen werden, die sich unter ihrer Einwirkung vollzog. Die Vergleichsgröße stellte hierbei die Zunahme der Zellzahl der unbehandelten Kontrollgruppe dar (ZZ diff). Hierbei handelte es sich um die Differenz der an Tag 0 (ZZ prae) und Tag 3 (ZZ post) ermittelten Zellzahlen:

$$ZZ \text{ diff} = ZZ \text{ post} - ZZ \text{ prae}$$

Um eine Relation zu den behandelten Ansätzen zu erhalten, wurde ZZ diff gleich 100 % gesetzt. Nun wurde für jede der 3 bzw. 6 zugegebenen Substanzkonzentrationen (K_i) die Zellzahl unter Einwirkung der Substanz bestimmt. Diese Zellzahl wurde als relatives Wachstum im Verhältnis zu ZZ diff ausgedrückt ($W K_i \%$). Dazu wurde die Differenz zwischen der unter Substanzugabe ermittelten Zellzahl ($ZZ K_i$) und der Ausgangskontrolle ($ZZ \text{ prae}$) ermittelt, durch ZZ diff dividiert und mit 100 multipliziert, um zu einer prozentualen Darstellung zu gelangen:

$$W K_i \% = \frac{(ZZ K_i - ZZ \text{ prae}) \times 100}{ZZ \text{ diff}}$$

$$\text{mit } i = 1, 2, 3, (4, 5, 6)$$

Die relativen Wachstumswerte ($W K_i \%$) und der Ausgangskontrollwert von 100 % (ZZ diff) konnten nun gegen die Konzentrationen aufgetragen werden.

2.8 Wachstumskurven

Um die Wachstumskinetik der jeweiligen Sarkomzelllinien zu bestimmen, wurde als Kontrolle eine Wachstumskurve jeder Zelllinie bestimmt. Hierzu wurde jede Kultur über mehrere Tage (7 bzw. 8) in 12# Cluster-Petrischalen ausgewertet. Wie in Abschnitt 2.6. beschrieben, wurde dazu wieder eine bestimmte Anzahl von Zellen pro Cluster ausgesät und alle 48 Stunden die Zahl der lebenden Zellen ermittelt. Diese Zahl konnte in der Grafik als Funktion der Zeit aufgetragen werden.

(siehe Anhang: Wachstumskurven)

2.9 Verdünnungsreihen

Um eine für den ausgewachsenen menschlichen Körper festgelegte Substanzkonzentration auf eine für die Zellkultur anwendbare Konzentration zu reduzieren, sind Verdünnungsreihen notwendig. Dieser Abschnitt zeigt die Herstellung der Verdünnungsreihen der angewandten Substanzen. Dazu werden zunächst Substanzgruppen, Produktnamen und Konzentrationen aufgeführt. Danach wird für jede Substanz der jeweiligen Substanzgruppe beschrieben, wie die Verdünnungsreihe hergestellt wurde. Im Fall der Androgene werden außerdem Vorversuche zur Löslichkeit dargestellt.

2.9.1 Prostaglandinderivate

2.9.1.1 PGE1 (Alprostadil)

2.9.1.1.1 Produktname und Hersteller

Prostavasin, Schwarz Pharma AG Monheim

2.9.1.1.2 Darreichungsform und Zusammensetzung

1 Ampulle mit 48,2 mg Trockensubstanz aufzulösen in
50 ml physiologischer Kochsalzlösung

1 Ampulle enthält:

Alprostadil-alpha-Cyclodextrin-Einschlußverbindung

666,7 µg bestehend aus: Alprostadil 20 µg

alpha-Cyclodextrin 646,7 µg

2.9.1.1.3 Angewandte Konzentrationen

Initialdosis laut Herstellerangabe: 10 µg über 60 - 120 min
(0,1 - 0,6 ng/ kg KG/ min)

Bei einem 70 kg schweren Körper mit ~ 14000 ml

Extrazellulärflüssigkeit (EZF) entspricht das:

10 µg/ 14000 ml

= 10 ng/ 14 ml

= 0,71 ng/ ml

Diese Konzentration wurde als mittlere Konzentration K_2
angenommen. Daraus ergaben sich folgende Werte:

K_3 = 7,1 ng/ ml (= 20,02 nmol/ l)

$3 \times K_2$ = 2,13 ng/ ml (= 6,008 nmol/ l)

K_2 = 0,71 ng/ ml (= 2,002 nmol/ l)

$3 \times K_1$ = 213 pg/ ml (= 600,8 nmol/ l)

$$K_1 = 71 \text{ pg/ ml} \quad (= 200,2 \text{ pmol/ l})$$

$$3 \times K_{0,1} = 21,3 \text{ pg/ ml} \quad (= 60,08 \text{ pmol/ l})$$

2.9.1.2 PGI₂ (Prostacyclin)

2.9.1.2.1 Produktname und Hersteller

Iloprost, Schering AG, Berlin

2.9.1.2.2 Darreichungsform und Zusammensetzung

Ampulle mit 1 ml Lösung (0,1 mg/ml)

2.9.1.2.3 Angewandte Konzentrationen

Herstellerangabe: 5 ng/ kg KG/ min

Körper: 70 kg, 14000 ml EZF:

$$350 \text{ ng/ 14000 ml}$$

$$= 350 \text{ pg/ 14 ml}$$

$$= \underline{25 \text{ pg/ ml}} = K_2$$

$$K_3 = 250 \text{ pg/ml} \quad (= 720,46 \text{ pmol/ l})$$

$$3 \times K_2 = 75 \text{ pg/ ml} \quad (= 216,13 \text{ pmol/ l})$$

$$K_2 = 25 \text{ pg/ ml} \quad (= 72,04 \text{ pmol/ l})$$

$$3 \times K_1 = 7,5 \text{ pg/ ml} \quad (= 21,61 \text{ pmol/ l})$$

$$K_1 = 2,5 \text{ pg/ ml} \quad (= 7,2 \text{ pmol/ l})$$

$$3 \times K_{0,1} = 0,75 \text{ pg/ ml} \quad (= 2,1 \text{ pmol/ l})$$

2.9.1.3 Herstellung der Verdünnungsreihen

2.9.1.3.1 Prostavasin

Die Stammlösung enthält 20 µg/ 50 ml

(= 400 ng/ ml)= Stammlösung (SL)

0,5 ml SL	+ 27,5 ml Medium	= K ₃	[7,1 ng/ ml] 4 ml
K ₃	+ 9,3 ml Medium	= 3xK ₂	[2,13 ng/ ml]
4 ml 3xK ₂	+ 8 ml Medium	= K ₂	[0,71 ng/ ml]
4 ml K ₂	+ 9,3 ml Medium	= 3xK ₁	[213 pg/ ml]
4 ml 3xK ₁	+ 8 ml Medium	= K ₁	[71 pg/ ml]
4 ml K ₁	+ 9,3 ml Medium	= 3xK _{0,1}	[21,3 pg/ ml]

2.9.1.3.2 Prostacyclin

Die Stammlösung enthält 0,1 mg/ml.

10 µl SL	+	990 µl Medium	= Vorverdünnung [1µg/ml]
10 µl VV ₁	+	990 µl Medium	= [10 ng/ml]
500 µl VV ₂	+	19,5 ml Medium	= K ₃ [250 pg/ml]
4 ml K ₃	+	9,3 ml Medium	= 3xK ₂ [75 pg/ml]
4ml 3xK ₂	+	8 ml Medium	= [25 pg/ml]
4 ml K ₂	+	9,3 ml Medium	= 3xK ₁ [7,5 pg/ml]
4 ml 3xK ₁	+	8 ml Medium	= K ₁ [2,5 pg/ml]
4 ml K ₁	+	9,3 ml Medium	= 3xK _{0,1} [0,75 pg/ml]

2.9.2 Erythropoietin

2.9.2.1 ERYPO4000

2.9.2.1.1 Hersteller

Cilag GmbH, Sulzbach/ Ts.

2.9.2.1.2 Darreichungsform und Zusammensetzung

Injektionsflasche mit 4000 Einheiten (entsprechend 33,6 µg)
Erythropoietin human, rekombiniert in 1 ml steriler,
gepufferter Proteinlösung

2.9.2.1.3 Angewandte Konzentrationen

Die Varianz der angegebenen Therapiedosen erstreckte sich
von 3x 15 E/kg KG bis 3x 200 E/kg KG. Für die Tests wurde
eine Dosis von 10 - 40 - 200 E/kg festgelegt.

Beispiel: 10 E/kg KG bei 70 kg = 700 E/ 14000 ml EZF =
0,05 E/ml = 50 m.E/ml.

2.9.2.1.3.1 Proliferationstestung

K_3 = 1000 m.E/ml

K_2 = 200 m.E/ml

K_1 = 50 m.E/ml

2.9.2.1.3.2 Zytotoxizitätstestung

K_3 = 1000 E/ml

K = 200 E/ml

K_1 = 50 E/ml

2.9.2.2 RECORMON1000

2.9.2.2.1 Hersteller

Boehringer Mannheim GmbH

2.9.2.2.2 Darreichungsform und Zusammensetzung

Injektionsflasche mit 1000 Einheiten Epoetin beta

Lösungsmittelampulle mit 1ml Wasser

2.9.2.2.3 Angewandte Konzentrationen

siehe ERYPO4000

2.9.2.3 Herstellung der Verdünnungsreihen

2.9.2.3.1 ERYPO 4000

- Proliferationstest

Stammlösung: 4000 E/ml (= 4 000 000 mE/ml
= 40 000 mE/ 10 µl)

10 µl SL + 40 ml Medium = K₃ (1000 mE/ ml)

8 ml K₃ + 32 ml Medium = K₂ (200 mE/ ml)

8 ml K₂ + 24 ml Medium = K₁ (50 mE/ ml)

- Zytotoxizitätstest

1 ml SL + 3 ml Medium = K₃ (1000 E/ml)

800 µl K₃ + 3,2 ml Medium =
K₂ (200 E/ml)

800 µl K₂ + 3,2 ml Medium =
K₁ (50 E/ml)

2.9.2.3.2 RECORMON 1000

- Proliferationstest

Stammlösung enthält 1000 E/ml.

40 µl SL + 40 ml Medium = K₃ (1000 m.E/ml)

8 ml K₃ + 32 ml Medium = K₂ (200 m.E/ml)

8 ml K₂ + 24 ml Medium = K₁ (50 m.E/ml)

- Zytotoxizitätstest

Stammlösung entspricht K₃ (1000 E/ml)

1,6 ml K₃ + 6,4 ml Medium = K₂ (200
E/ml)

1,6 ml K₂ + 6,4 ml Medium = K₁ (50 E/ml)

2.9.3 Androgene

Im Fall des Testosterons und seiner Derivate mußten Vorversuche zur Löslichkeit unternommen werden, da es in den höchsten Konzentrationen zum Ausfällen der Substanzen kam. So wurden Vorverdünnungen (VV; Lösungsmittel Äthanol)

hergestellt, die dann zu den entsprechenden Konzentrationen weiterverdünnt wurden. Wie in 2.7. dargestellt wurde eine weitere ZZ post ausgesät, der das Lösungsmittel in seiner höchsten vorkommenden Konzentration (hier bei 10xK3 = 1‰) hinzugefügt wurde, um eine Kontrolle über eventuelle Wirkungen des Äthanol auf die Zellkultur zu haben.

2.9.3.1 Testosteron

2.9.3.1.1 Hersteller

Fa. Sigma

2.9.3.1.2 Darreichungsform

Flasche mit 1g Trockensubstanz

2.9.3.1.3 Angewandte Konzentrationen

Die Konzentrationen wurden anhand des Plasmaspiegels von Testosteron (Varianz: 10 - 4 ng/ml) festgelegt.

10x K ₃	= 1 µg/ml	(3,46 µmol/ml)
K ₃	= 100 ng/ml	(0,34 µmol/ml)
3x K ₂	= 30 ng/ml	(104,02 nmol/ml)
K ₂	= 10 ng/ml	(34,6 nmol/ml)
3x K ₁	= 3 ng/ml	(10,4 nmol/ml)

$$K_1 = 1 \text{ ng/ml} \quad (3,46 \text{ nmol/ml})$$

2.9.3.2 Nandralon

2.9.3.2.1 Hersteller

Fa. Sigma

2.9.3.2.2 Darreichungsform

Flasche mit 100 µg Trockensubstanz

2.9.3.2.3 Angewandte Konzentrationen

siehe Testosteron (durch das unterschiedliche Molekulargewicht ergibt sich lediglich eine andere mol-Konzentration)

$$10 \times K_3 = 3,64 \text{ µmol/ml}$$

$$K_3 = 0,36 \text{ µmol/ml}$$

$$3 \times K_2 = 109,3 \text{ nmol/ml}$$

$$K_2 = 36,4 \text{ nmol/ml}$$

$$3 \times K_1 = 10,9 \text{ nmol/ml}$$

$$K_1 = 3,64 \text{ nmol/ml}$$

2.9.3.3 Stanozolol

2.9.3.3.1 Hersteller

Fa. Sigma

2.9.3.3.2 Darreichungsform

Flasche mit 1g Trockensubstanz

2.9.3.3 Angewandte Konzentrationen

siehe Nandralon

$$10 \times K_3 = 3,04 \mu\text{mol/ml}$$

$$K_3 = 0,304 \mu\text{mol/ml}$$

$$3 \times K_2 = 91,3 \text{ nmol/ml}$$

$$K_2 = 30,4 \text{ nmol/ml}$$

$$3 \times K_1 = 9,13 \text{ nmol/ml}$$

$$K_1 = 3,04 \text{ nmol/ml}$$

2.9.3.4 Herstellung der Verdünnungsreihen

2.9.3.4.1 Testosteron

vom Hersteller angegebenes Lösungsverhältnis:

100 mg/ml (Stammlösung SL)

100 μl SL	+	9,9 ml Medium	= VV	(1000 $\mu\text{g/ml}$)
10 μl VV	+	10 ml Medium	= 10x K_3	(1 $\mu\text{g/ml}$)
1,5 ml 10x K_3	+	13,5 ml Medium	= K_3	(100 ng/ml)
4 ml K_3	+	9,3 ml Medium	= 3x K_2	(30 ng/ml)
4 ml 3x K_2	+	8 ml Medium	= K_2	(10 ng/ml)
4 ml K_2	+	9,3 ml Medium	= 3x K_1	(3 ng/ml)
4 ml 3x K_1	+	8 ml Medium	= K_1	(1 ng/ml)

2.9.3.4.2 Nandralon

Stammlösung 50 mg/ml

100 µl SL	+ 9,9 ml Äthanol	= Vorverdünnung (500µg/ml)
25 µl VV	+ 12,5 ml Medium	= 10xK ₃ (1 µg/ml)
1,5 ml 10xK ₃	+ 13,5 ml Medium	= K ₃ (100 ng/ml)
4 ml K ₃	+ 9,3 ml Medium	= 3xK ₂ (30 ng/ml)
4 ml 3xK ₂	+ 8 ml Medium	= K ₂ (10 ng/ml)
4 ml K ₂	+ 9,3 ml Medium	= 3xK ₁ (3 ng/ml)
4 ml 3xK ₁	+ 8 ml Medium	= K (1 ng/ml)

2.9.3.4.3 Stanozolol

Stammlösung 50 mg/ 4 ml

400 µl SL	+ 9,6 ml Äthanol	= Vorverdünnung (500µg/ml)
25 µl VV	+ 12,5 ml Medium	= 10xK ₃ (1µg/ml)
1,5 ml 10xK ₃	+ 13,5 ml Medium	= K ₃ (100 ng/ml)
4 ml K ₃	+ 9,3 ml Medium	= 3xK ₂ (30 ng/ml)
4 ml 3xK ₂	+ 8 ml Medium	= K ₂ (10 ng/ml)
4 ml K ₂	+ 9,3 ml Medium	= 3xK ₁ (3 ng/ml)
4ml 3xK ₁	+ 8 ml Medium	= K ₁ (1 ng/ml)

2.10 Übersicht der angewandten Konzentrationen

2.10.1 ERYPO und RECORMON

2.10.1.1 Proliferationstestung

K_3 = 1000 m.E/ml

K_2 = 200 m.E/ml

K_1 = 50 m.E/ml

2.10.1.2 Zytotoxizitätstestung

K_3 = 1000 E/ml

K_2 = 200 E/ml

K_1 = 50 E/ml

2.10.2 Prostaglandine

2.10.2.1 PGE1 (Alprostadil)

K_3 = 7,1 ng/ ml (20,02 nmol/ l)

$3 \times K_2$ = 2,13 ng/ ml (6,008 nmol/ l)

K_2 = 0,71 ng/ ml (2,002 nmol/ l)

$3 \times K_1$ = 213 pg/ ml (600,8 nmol/ l)

K_1 = 71 pg/ ml (200,2 pmol/ l)

$3 \times K_{0,1}$ = 21,3 pg/ ml (60,08 pmol/ l)

2.10.2.2 PGI₂ (Prostacyclin)

K ₃	= 250 pg/ml	(720,46 pmol/ l)
3xK ₂	= 75 pg/ ml	(216,13 pmol/ l)
K ₂	= 25pg/ ml	(72,04 pmol/ l)
3xK ₁	= 7,5 pg/ ml	(21,61 pmol/ l)
K ₁	= 2,5 pg/ ml	(7,2 pmol/ l)
3xK _{0,1}	= 0,75 pg/ ml	(2,1 pmol/ l)

2.10.3 Androgene

2.10.3.1 Testosteron

10x K ₃	= 1 µg/ml	(3,46 µmol/ml)
K ₃	= 100 ng/ml	(0,34 µmol/ml)
3x K ₂	= 30 ng/ml	(104,02 nmol/ml)
K ₂	= 10 ng/ml	(34,6 nmol/ml)
3x K ₁	= 3 ng/ml	(10,4 nmol/ml)
K ₁	= 1 ng/ml	(3,46 nmol/ml)

2.10.3.2 Nandralon

10x K ₃	= 1 µg/ml	(3,64 µmol/ml)
K ₃	= 100 ng/ml	(0,36 µmol/ml)
3x K ₂	= 30 ng/ml	(109,3 nmol/ml)
K ₂	= 10 ng/ml	(36,4 nmol/ml)
3x K ₁	= 3 ng/ml	(10,9 nmol/ml)
K ₁	= 1 ng/ml	(3,64 nmol/ml)

2.10.3.3 Stanozolol

10x K3	= 1 µg/ml	(3,04 µmol/ml)
K3	= 100 ng/ml	(0,304 µmol/ml)
3x K2	= 30 ng/ml	(91,3 nmol/ml)
K2	= 10 ng/ml	(30,4 nmol/ml)
3x K1	= 3 ng/ml	(9,13 nmol/ml)
K1	= 1 ng/ml	(3,04 nmol/ml)

3 Ergebnisse

3.1 ERYTHROPOIETIN

3.1.1 ERYPO 4000 (Proliferationsassay)

Im Proliferationsassay zeigen die Zelllinien ein relativ uneinheitliches Bild. Während drei Linien (Liposarkom 86/197, Fibrosarkom 87/072, Fibrosarkom 89/096) keine wesentliche Abweichung ihres Wachstumsverhaltens gegenüber der unbehandelten Kontrollprobe zeigen, ist bei fünf Linien (Liposarkom 87/214, malignes Schwannom 89/063 ab Konzentration K_2 , malignes Schwannom 86/324, Rhabdomyosarkom 89/148, Rhabdomyosarkom 87/266) ein leichter inhibitorischer Effekt zu beobachten (Abb. 1 u. Abb. 2).

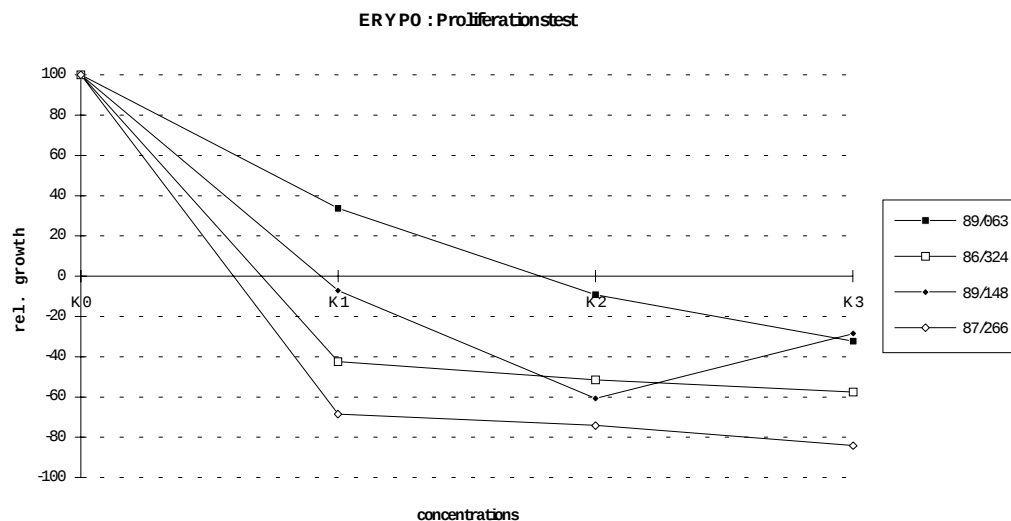


Abb.1

In der Konzentration K1 (50 m.E./ml) liegt dieser Effekt im Bereich von 33,8 % des Wachstums der Leerprobe (89/063) bis 166,4 % (87/214).

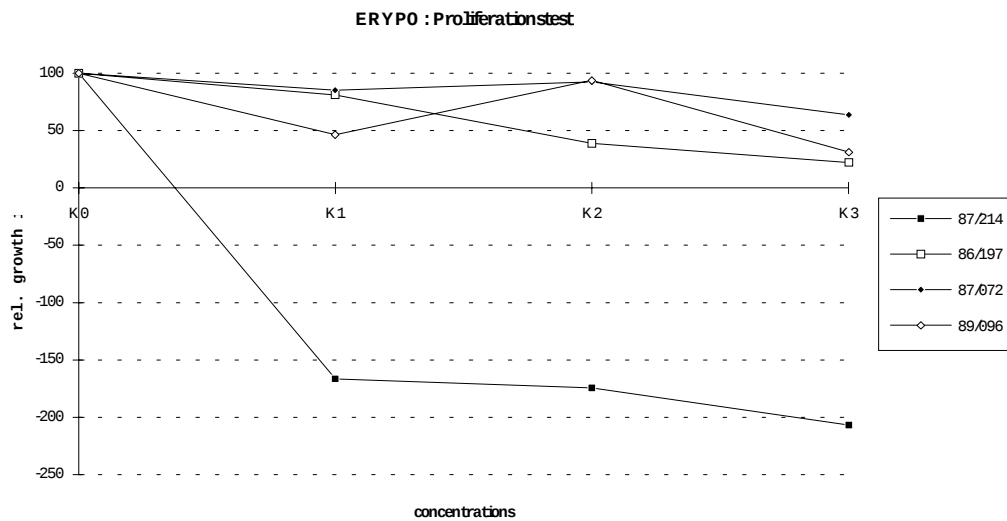


Abb. 2

In der Konzentration K_2 (200 m.E./ml) fallen alle fünf Linien unter 0 % (-9,2 % bis -174,4 %).

Auffällig an der nächsten Konzentrationsstufe ($K_3 = 1000$ m.E./ml) ist das Wachstumsverhalten des Rhabdomyosarkoms 89/148. Während die vier übrigen Linien eine weitere Verringerung des relativen Wachstums zeigen (-32,3 % bis -206,8 %), steigt es bei 89/148 wieder an, bleibt aber mit -28,5 % im negativen Bereich. Die drei Sarkomzelllinien, die keine signifikante Änderung ihres Wachstums zeigen, bleiben über alle drei Konzentrationen im Bereich von 22,2 % bis 93,8 % relativen Wachstums.

3.1.2 RECORMON (Proliferationsassay)

Hier zeigen fünf Linien (87/214, 89/148, 87/266, 89/063, 86/324) bereits in der Konzentration K_1 einen inhibitorischen Effekt im Bereich von -21,4 % bis -109,9 % (Abb. 3 u. Abb. 4).

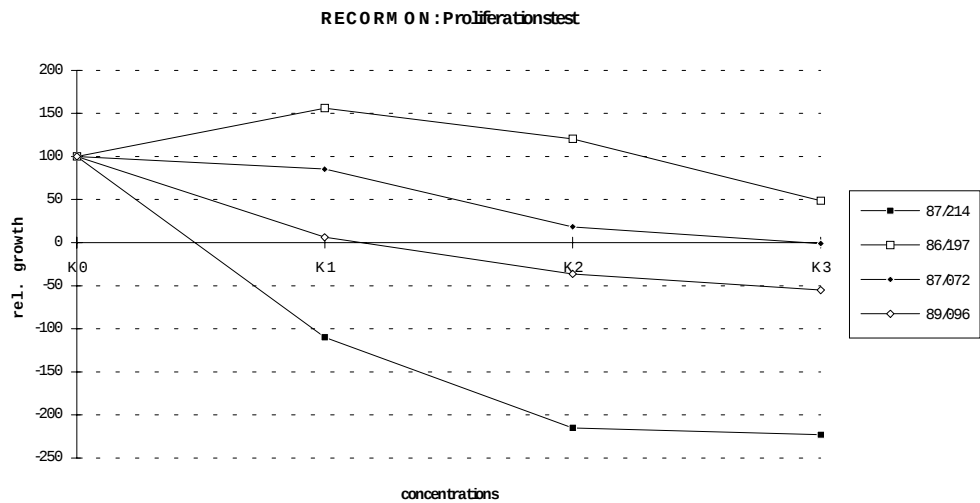
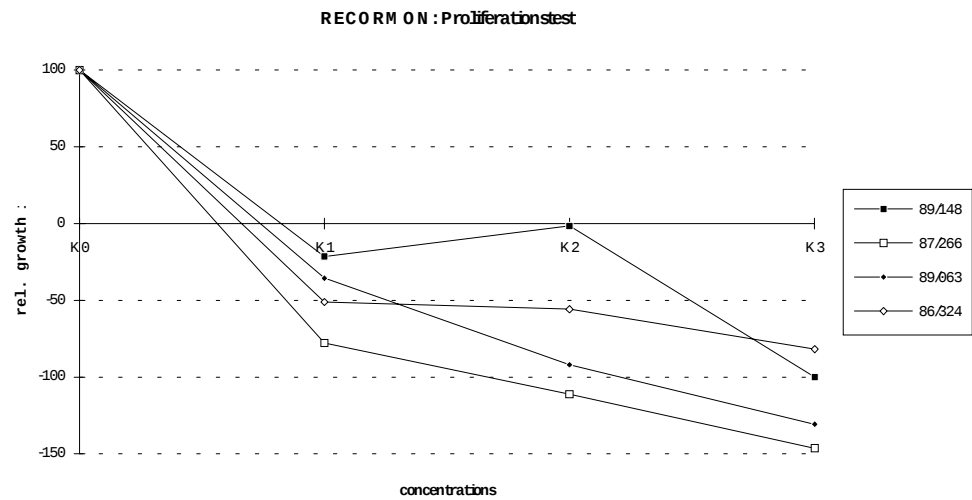


Abb. 3 (oben) u. Abb. 4

Die Zellen der beiden Fibrosarkome (87/072 und 89/096) verringern zwar auch ihr Wachstum auf 85,4 % bzw. 6,3 %, bleiben aber im positiven Bereich. Das Wachstum des Liposarkoms 86/197 steigt in dieser Konzentration auf 156,1 %, um in der Konzentration K_2 wieder abzusinken (120,4 %). In der Konzentration K_3 ist diese Linie die Einzige, die im Bereich positiven relativen Wachstums bleibt (48,7 %). Die übrigen Sarkomzelllinien demonstrieren in den Konzentrationen K_2

und K₃ ein annähernd lineares Absinken des relativen Wachstums im Bereich von 18,3 % bis -214,9 % (K₂) bzw. -1 % bis -222,9 % (K₃). Lediglich die Zelllinie 89/148 (Rhabdomyosarkom) zeigt bei K₂ einen Peak auf -1,4 %, bleibt aber im negativen Bereich.

3.1.3 ERYPO 4000 (Zytotoxizitätstest)

In dieser Versuchsreihe wurden die Sarkomzelllinien mit unphysiologisch hohen Dosen rHuEpo von 1000 i.E./ml (K₃), 200 i.E./ml (K₂) und 50 i.E./ml (K₁) behandelt. Diese Dosierungen gelten auch für den Zytotoxizitätstest mit RECORMON (siehe 1.4.).

In der Konzentrationsstufe K₁ zeigen die Linien ein uneinheitliches Bild (Abb. 5 u. Abb. 6).

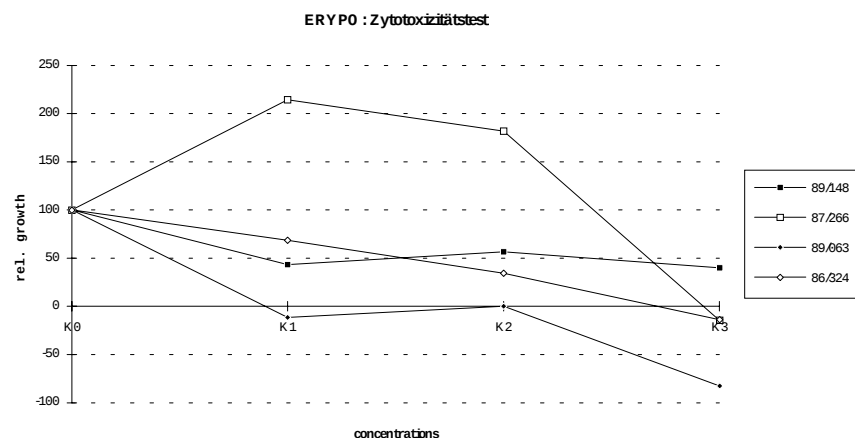


Abb. 5

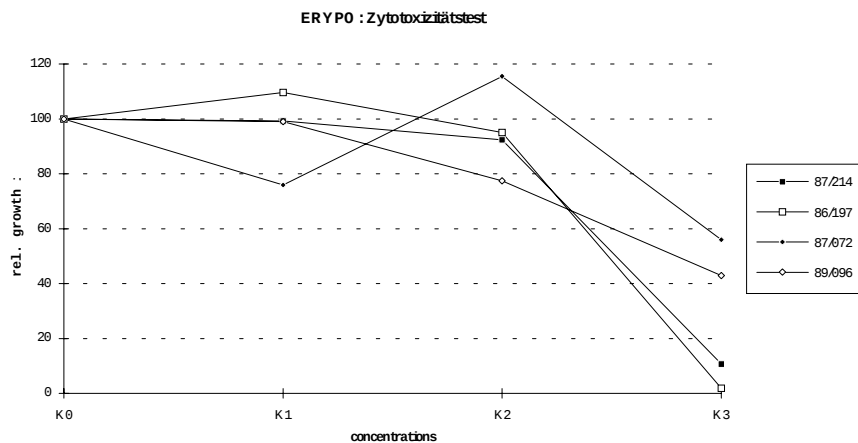


Abb. 6

Während sechs Linien einen Abfall im Bereich von 99,3 % bis 43,5 % ihres relativen Wachstums - lediglich eine, das maligne Schannom 89/063 fällt hier unter 0 % (-11,5 %) - demonstrieren, ist bei zwei Zelllinien ein Anstieg des Wachstums zu beobachten. Ist dieser Anstieg bei der Linie 86/197 (Liposarkom) mit 109,7 % noch recht gering, fällt er bei 87/266 (Rhabdomyosarkom) mit 214,4 % sehr deutlich aus. In der Konzentration K2 zeigen zwei Linien einen geringfügigen Wiederanstieg ihres Wachstums (Rhabdomyosarkom 89/148 von 43,5 % auf 56,5 %; Schwannom 89/063 von -11,5 % auf 0 %). Einen sehr drastischen Wiederanstieg zeigt das Fibrosarkom 87/072 (von 75,9 % auf 115,5 %). Alle übrigen Zelllinien demonstrieren eine Verringerung ihrer Wachstumsaktivität im Bereich von 34,3 % bis 95,1 %. Das Rhabdomyosarkom 87/266 zeigt zwar mit einer Verringerung von 214,4 % auf 181,8 % ebenfalls ein Absinken seiner Wachstumsaktivität, bleibt aber deutlich im Bereich über 100 %. In der Konzentration K3 liegen fünf Linien im Bereich von 56 % bis 1,9 % relativen Wachstums, drei Zelllinien im negativen Bereich von 13,9 % bis -82,7 %.

3.1.4 RECORMON (Zytotoxizitätstest)

In dieser Versuchsreihe (Abb. 7 u. 8) zeigen fünf Zelllinien in der Konzentration K1 einen Abfall ihre Wachstumsaktivität im Bereich von 72,3 % (87/072) bis -43,1 % (89/063). Die Zellen des Rhabdomyosarkoms 87/266 demonstrieren ein geringfügiges Ansteigen ihres relativen Wachstums auf 114,4 %. Auffallend ist hier die Reaktion der beiden Liposarkomzellreihen. Beide zeigen einen deutlichen Stimulationseffekt, der sich für 87/214 auf 243,1 % und für 86/197 auf 193,1 % beläuft.

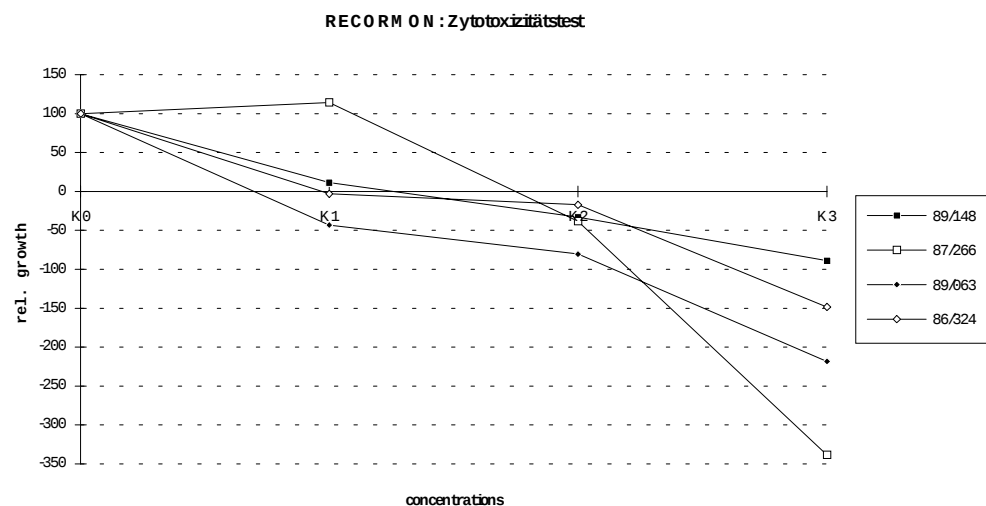


Abb. 7

In der Konzentrationsstufe K2 liegen vier Linien noch im Bereich positiven Wachstums (101,5 % bis 37,4 %), während die übrigen Zelllinien im negativen Bereich (-17,1 % bis -80,4 %) liegen.

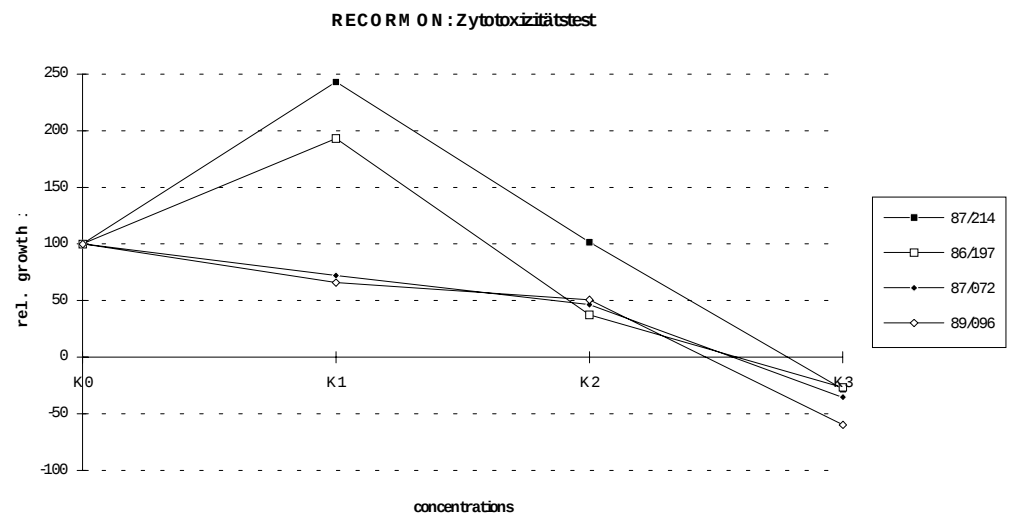


Abb. 8

3.2 ANDROGENE

Bei diesen Versuchsreihen wurden die Grafiken pro Zelllinie angefertigt, um die drei Substanzen in ihrer Wirkung direkt vergleichen zu können.

Im Anhang finden sich weitere Grafiken, die einen Vergleich der Zelllinien für jede der einzelnen Substanzen ermöglichen.

3.2.1 Liposarkom 86/214 (Abb. 1)

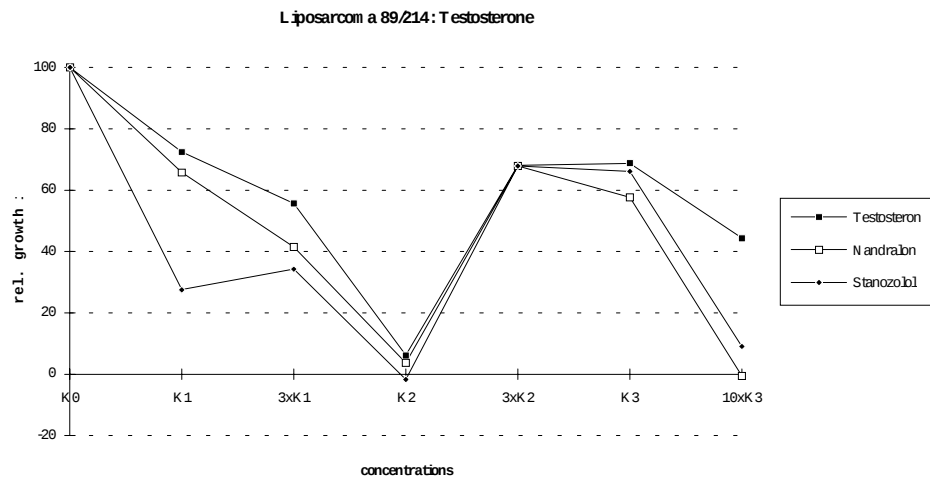


Abb. 1

In den Konzentrationen K_1 , $3xK_1$ und K_2 (Dosierungen siehe MATERIAL UND METHODEN) zeigt das Liposarkom bei allen drei Substanzen ein relativ lineares Absinken seiner Wachstumsaktivität auf Werte von 6,2 % bis -1,7 %. In der Konzentration $3xK_2$ ist ein Wiederanstieg des Wachstums zu beobachten (68,1 % bzw. 67,9 %). Diese Werte werden bei K_3 annähernd gehalten. Bei $10xK_3$ ist wiederum ein Abfallen der Wachstumsaktivität zu bemerken. (Werte von 44,4 % bis -0,5 %).

3.2.2 Liposarkom 86/197 (Abb. 2)

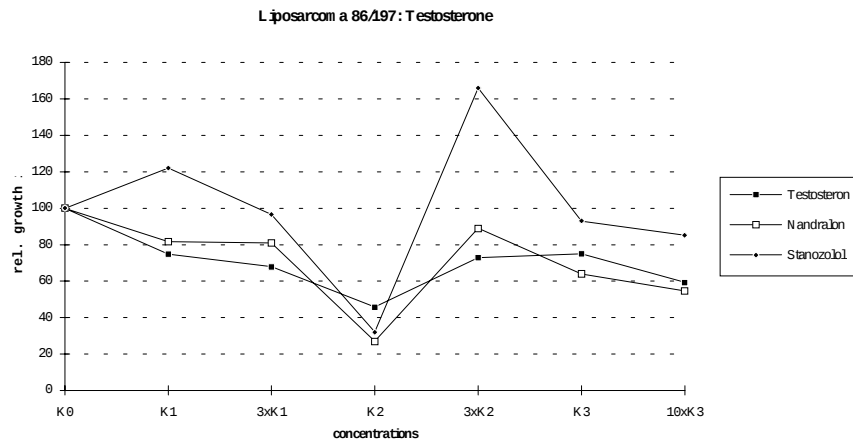


Abb. 2

Dieses Sarkom zeigt ein ähnliches Verhalten wie 89/214. Das relative Wachstum verringert sich auf Werte von 45,8 % bis 32,1 % in der Konzentration K_2 , um in $3xK_2$ wieder anzusteigen. In den Konzentrationen K_3 und $10xK_3$ ist wieder ein Absinken der Wachstumsaktivität auf Werte von 85,1 % bis 54,7 % zu beobachten. Auffallend ist hier die Reaktion der Liposarkomzellen auf die Konzentrationen K_1 und $3xK_2$ von Stanozolol. In beiden Fällen ist ein Anstieg des relativen Wachstums über 100 % zu bemerken

$$(K_1 = 122,1 \%, 3xK_2 = 166 \%).$$

3.2.3 Malignes Schwannom 89/063 (Abb. 3)

Hier ist ebenfalls ein ähnliches Bild wie bei den beiden vorherigen Linien zu beobachten. Augenfällig ist lediglich, daß die Wachstumsminima in den Konzentrationen K_2 und $10xK_3$ mit Werten von -170,8 % bis -266,6 % bzw. -80 % bis -258,3 % andere Größenordnungen erreichen.

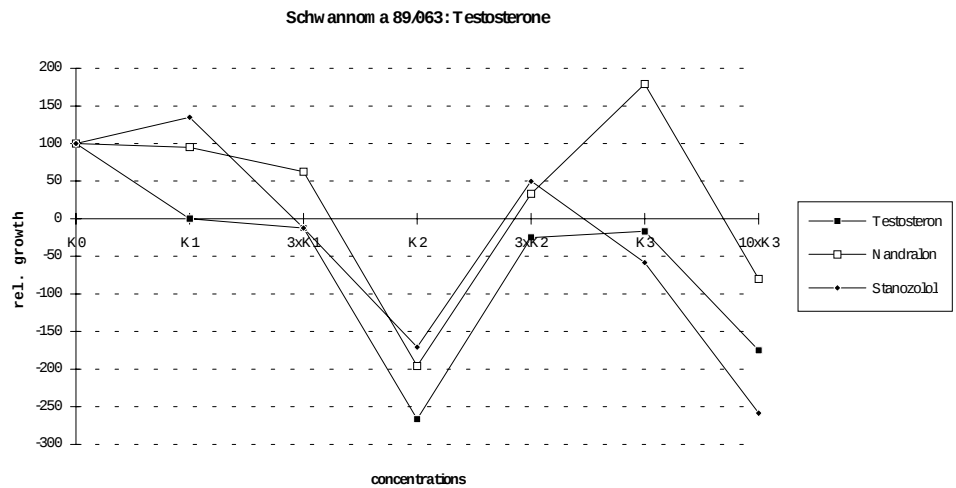


Abb. 3

In der Konzentration K3 für Nandralon ist ein Peak auf 179,2 % relativen Wachstums zu erkennen.

3.2.4 Malignes Schwannom 86/324 (Abb. 4)

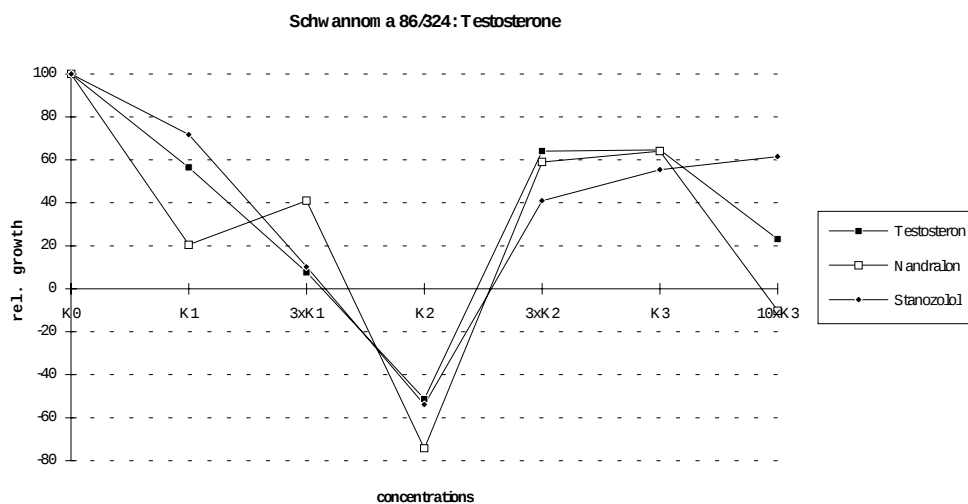


Abb. 4

Die Werte des relativen Wachstums sinken auch hier gradlinig, um in K_2 mit -51,3 % bis -74,3 % ihr Minimum zu erreichen. Nur für Nandralon ist zwischen K_1 und $3xK_1$ ein Anstieg von 20,5 % auf 41 % zu erkennen. In den höheren Konzentrationsbereichen $3xK_2$ und K_3 vergrößert sich das Wachstum erneut auf Werte von 41 % bis 64,6 %. In der Konzentration $10xK_3$ steigt lediglich der Wert für Stanozolol an (61,5 %), die Werte für Testosteron und Nandralon fallen auf 23,1 % bzw. -10,2 %.

3.2.5 Rhabdomyosarkom 87/266 (Abb. 5)

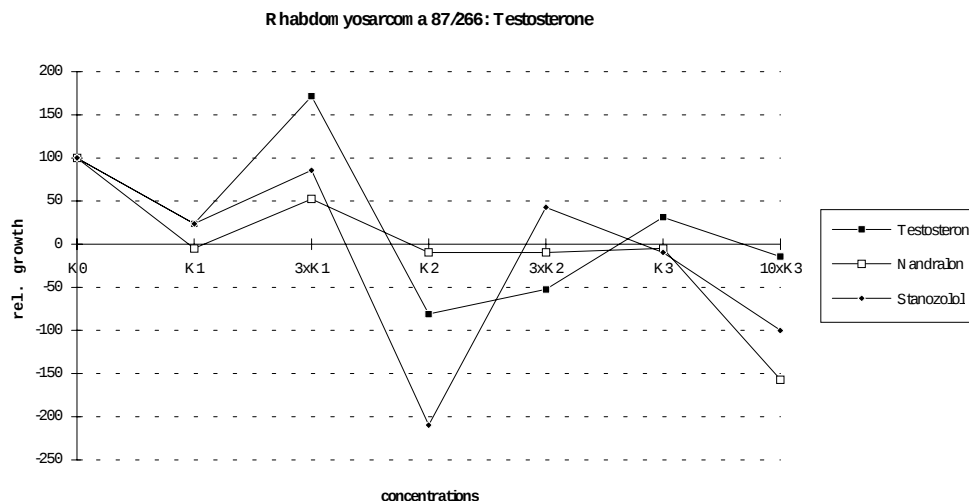


Abb. 5

Dieses Sarkom zeigt ein vergleichsweise uneinheitliches Bild. Nachdem das relative Wachstum in der Konzentration K_1 auf 23,8 % bis -4,7 % abnimmt, steigt es für alle drei Androgene in $3xK_1$ auf Werte von 52,4 % bis 171,5 % an. Auch bei dieser Zelllinie ist in der Konzentration K_2 ein Wachstumsminimum zu erkennen, das aber mit -9,5 % bis -209,6 % sehr viel breiter als bei den übrigen Linien gestreut ist. In den Konzentrationen $3xK_2$ und K_3 erhöht sich das

Wachstum erneut, um in $10 \times K_3$ mit Werten von -14,3 % bis -157 % ein weiteres Minimum zu erreichen.

3.2.6 Rhabdomyosarkom 89/148 (Abb. 6)

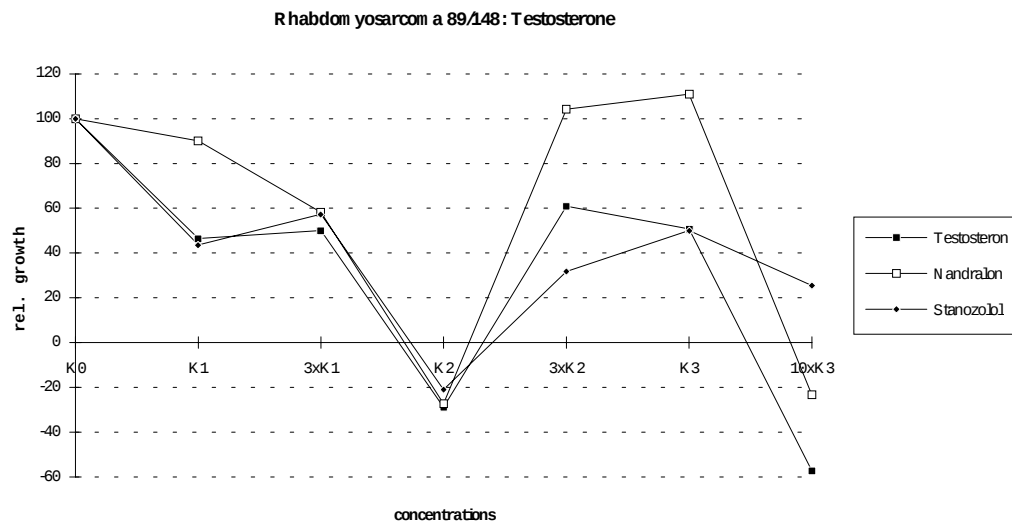


Abb. 6

Allein unter der Einwirkung von Nandralon wird hier das Wachstumsminimum bei K_2 gradlinig erreicht. In der Konzentration K_1 für Testosteron und Stanozolol fällt zwar das relative Wachstum auf 46,4% bzw. 43,6%, steigt in $3 \times K_1$ wieder geringfügig an (50% bzw. 57,3%). Die Werte für die Konzentration K_2 liegen für alle drei Substanzen im negativen Bereich (-20,9% bis -28,9%). Während die Werte für Testosteron und Stanozolol in den Konzentrationen $3 \times K_2$ und K_3 zwischen 31,8% bis 60,9% liegen, erhöht sich der Wert für Nandralon auf 104,2% bzw. 110,9%. Bis auf den Wert für Stanozolol (25,5 %) liegen in der Konzentration $10 \times K_3$ die Werte im negativen Bereich.

3.2.7 Fibrosarkom 89/096 (Abb.7)

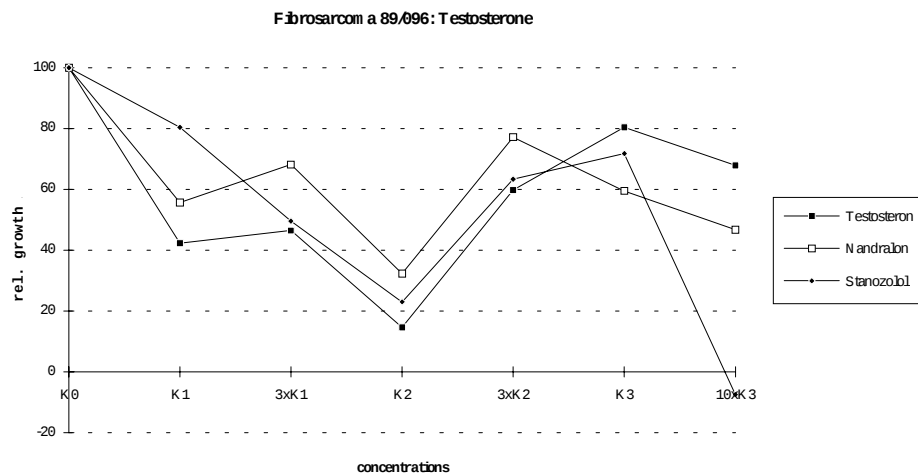


Abb. 7

Bei dieser Linie steigen die Werte für Testosteron und Nandralon von K_1 auf $3xK_1$ von 42,3% auf 46,5% bzw. 55,7% auf 68,2%, während sich das relative Wachstum unter Einwirkung von Stanazolol linear von 80,4% auf 49,6% verringert. In der Konzentration K_2 liegen die Werte aller drei Substanzen im Bereich von 32,3% bis 14,7%. Auch diese Zelllinie demonstriert in der Konzentration $3xK_2$ einen Wiederanstieg ihres Wachstums (59,8% bis 77,2%). Während die Werte für Testosteron und Stanazolol in der Konzentration K_3 weiter ansteigen (80,4% bzw. 71,8%), fällt der Wert für Nandralon auf 59,5% und in $10xK_3$ auf 46,8%. In dieser Konzentration verringert sich der Testosteron-Wert geringfügig auf 67,9%, indes der Wert für Stanazolol eine sehr deutliche Verringerung auf -7,5% relativen Wachstums zeigt.

3.2.8 Fibrosarkom 87/072 (Abb. 8)

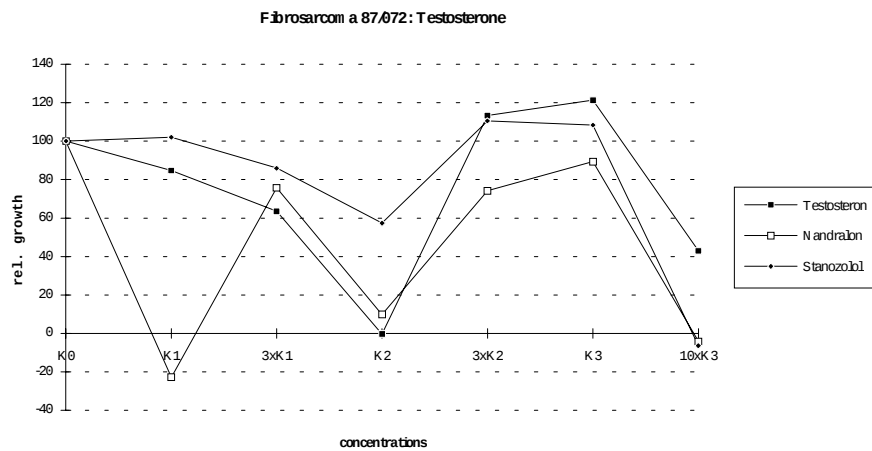


Abb. 8

Diese Sarkomzelllinie demonstriert ein im Wesentlichen den übrigen Linien ähnliches Wachstumsverhalten unter Einwirkung der Androgene. Das relative Wachstum nimmt in den Konzentrationen K_1 und $3xK_1$ annähernd linear ab, um in K_2 ein Minimum zu erreichen. Abweichend von den anderen Linien stellt sich bei dieser Linie mit dem K_1 -Wert für Nandralon (-22,7%) ein weiteres Wachstumsminimum dar. Auffällig ist weiterhin, daß der K_2 -Wert für Stanozolol (57,4%) nicht im unmittelbaren Bereich der beiden übrigen Werte (9,9% bzw. -0,3%) liegt. In den Konzentrationen $3xK_2$ und K_3 steigen die Werte erneut an. Sie liegen hier allerdings für Testosteron und Stanozolol im Bereich über 100% relativen Wachstums (108,4% bis 121,4%). In der höchsten Konzentration $10xK_3$ nimmt das Wachstum wieder ab (43% für Testosteron) und erreicht mit -4,1% für Nandralon bzw. -6,4% für Stanozolol negative Werte.

3.2.9 Zusammenfassung

In den vorliegenden Grafiken ist deutlich ein ähnliches Verhalten der Zelllinien unter Einwirkung der drei Steroide zu erkennen. Das relative Wachstum der Sarkomzellen nimmt in den Konzentrationen K_1 und $3 \times K_1$ annähernd linear ab und erreicht in K_2 ein Minimum. Anschließend steigt das Wachstum in den Konzentrationen $3 \times K_2$ und K_3 wieder an und fällt in $10 \times K_3$ erneut auf ein Minimum. Dieses Verhalten wird auch von den sich im Anhang befindenden Grafiken dokumentiert.

3.3 PROSTAGLANDINE

3.3.1 PGE₁ (Prostavasin)

Die zehn in diesem Proliferationsassay getesteten Sarkomzelllinien zeigen unter der Einwirkung von PGE₁ sehr unterschiedliche Reaktionen (Abb.1 und Abb.2). In der Konzentration 3xK_{0,1} (Dosierung siehe MATERIAL und METHODEN) bleiben drei Linien - das maligne Schwannom 86/324 mit 100%, das Rhabdomyosarkom 87/266 mit 96,1% und das Liposarkom 87/214 mit 14,1% - im Bereich zwischen 0 bis 100% relativen Wachstums. Das Rhabdomyosarkom 89/148 steigt in dieser Konzentration auf 169,1%.

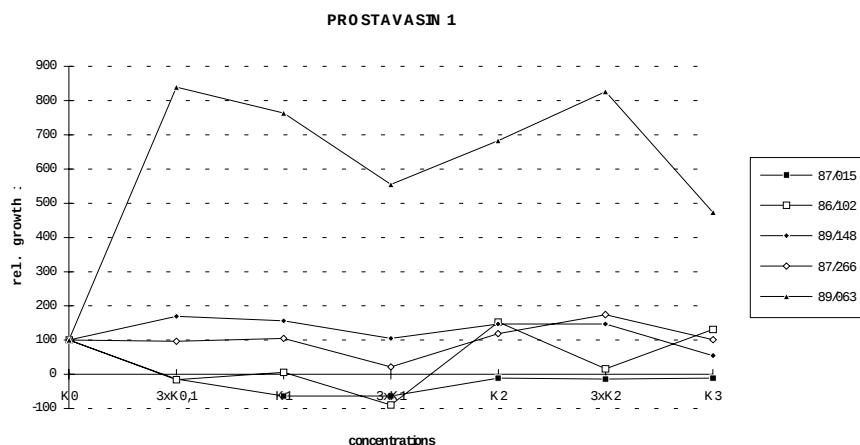


Abb. 2

Das Wachstum zweier Linien fällt mit -14,4% und -15,8% geringfügig in den negativen Bereich (maligne fibröse Histiozytome 87/015 bzw. 86/102). Die übrigen vier Linien zeigen hier einen deutlichen Stimulationseffekt (Fibrosarkom 89/096: 227,2%, Liposarkom 86/197: 290%, Fibrosarkom 89/072: 447,7%, malignes Schwannom 89/063: 839,6%). Auch in K₁ bleiben diese Linien klar im Bereich über 200% relativen Wachstums. Alle anderen Linien behalten ihre

Wachstumswerte aus 3xK_{0,1} ungefähr bei, lediglich das Histiocytom 87/015 fällt weiter auf -63,5%, während das Schwannom 86/324 auf 139,1% steigt.

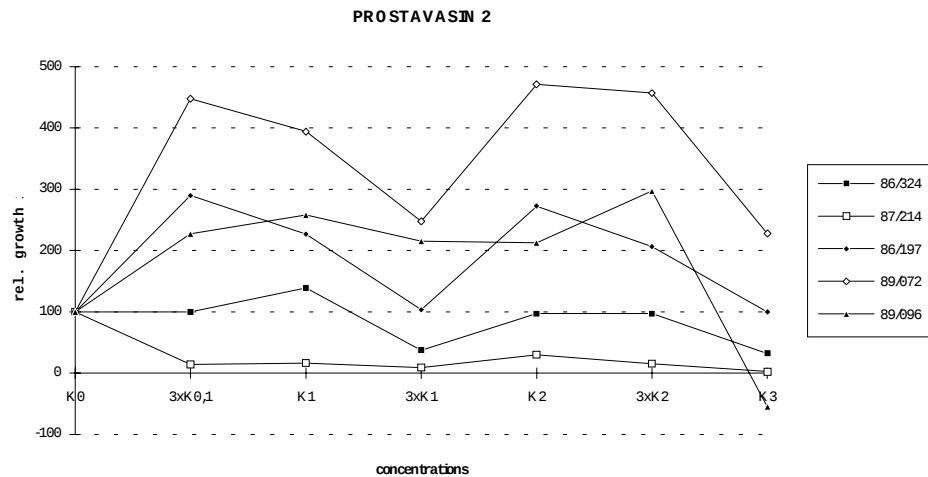


Abb. 2

In der Konzentration 3xK₁ zeigen neun Linien ein Absinken ihrer Wachstumsaktivität. Trotz dieser Verringerung bleiben drei Linien im Bereich über 200% Wachstum (89/096 mit 215,4%, 89/072 mit 247,7% und 89/063 mit 555,5%). Das Histiocytom 87/015 behält den Wert aus K₁ bei, während das Histiocytom 87/015 mit -89,5% sein Wachstumsminimum erreicht. Bis auf die Zellen des Fibrosarkoms 89/096, die in der Konzentration K₂ den Wert aus 3xK₁ annähernd halten (212,9%), zeigen alle übrigen Linien ein erneutes Ansteigen ihrer Wachstumsaktivität in K₂.

In 3xK₂ erhöht sich in drei Fällen (89/096, 89/063 und 87/266) das relative Wachstum, in fünf Fällen werden die Werte aus K₂ ungefähr gehalten. Zwei Linien demonstrieren ein deutliches Absinken ihres Wachstums gegenüber K₂ (Liposarkom 86/197 von 272,6% auf 206,6%, Histiocytom 86/102 von 152,5% auf 15,8%).

In der höchsten Konzentration K₃ nimmt bei acht Linien die Wachstumsaktivität unterschiedlich stark ab, wobei dieses Absinken

am augenfälligsten bei dem Fibrosarkom 89/096 ist (297,3% auf -54,6%). Während das Histiozytom 87/015 seinen Wachstumswert aus 3xK2 annähernd hält (-11,2%), steigt das relative Wachstum des Histiozytoms 86/102 noch einmal an)131,5%).

3.3.2 PGI₂ (PROSTACYCLIN)

Unter der Einwirkung von PGI₂ zeigen die Zelllinien Reaktionen, die den in 3.1 beschriebenen ähnlich sind (Abb. 3 und Abb. 4).

Das Bild in der Konzentration 3xK_{0,1} ist auch hier sehr weit gefächert. Drei Linien zeigen einen Stimulationseffekt (Schwannom 89/063: 422,2%, Fibrosarkome 89/072 und 89/096: 492% bzw. 231,3%), drei Zelllinien steigern ihr Wachstum auf Werte über 100% (Rhabdomyosarkom 87/266: 150%, Liposarkom 86/197: 160,4%, Schwannom 86/324: 107,9%), zwei Linien bleiben im Bereich zwischen 100% und 0% relativen Wachstums (Rhabdoyosarkom 89/148: 96,1% und Liposarkom 87/214: 25,6%), während die beiden Histiozytome 87/015 und 86/102 in den negativen Bereich fallen (-1,3% bzw. -79%).

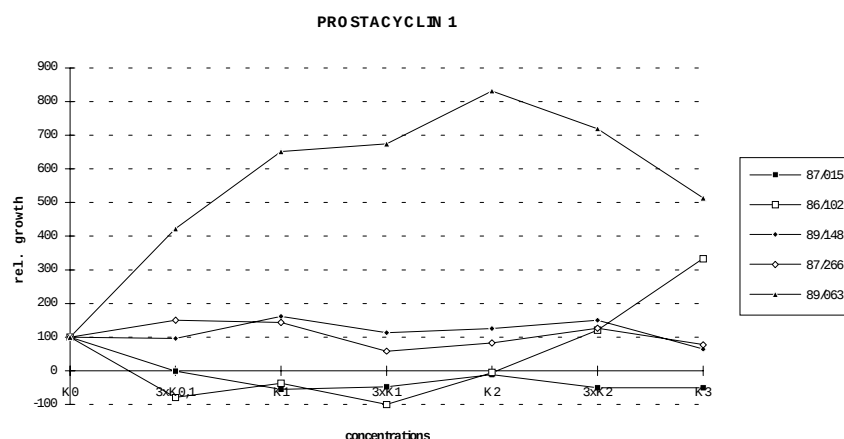


Abb. 3

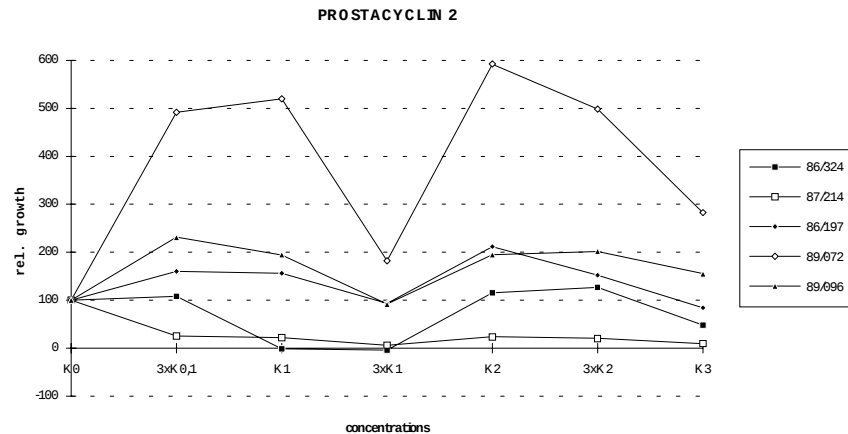


Abb. 4

In der nächsthöheren Konzentration K_1 werden die Werte aus $3xK_{0,1}$ annähernd gehalten. Lediglich zwei Linien zeigen eine auffällige Änderung ihres Wachstumsverhaltens: das Schwannom 89/063 mit einem weiteren Anstieg des relativen Zellwachstums von 422,2% auf 651,8% und das Schwannom 86/324 mit einem Absinken von 107,9% auf -1,6%.

In $3xK_1$ nimmt das relative Wachstum bei acht Linien ab, während zwei Linien ein geringfügiges Ansteigen zeigen (87/015 von -54,9% auf -47,1%, 89/063 von 651,8% auf 674,3%). Die Wachstumsabnahme fällt in dieser Konzentration bei den beiden Fibrosarkomzelllinien am deutlichsten aus (89/096 von 194,6% auf 91,8%, 89/072 von 519,9% auf 182,5%).

In der Konzentration K_2 demonstrieren alle Linien ein Anstieg ihrer Wachstumsaktivität, der bei 89/072 am auffälligsten ist (182,5% auf 592,5%). Vier Linien (86/324, 86/197, 89/096 und 89/063) zeigen einen Anstieg von über 100%.

Ein indifferentes Verhalten demonstrieren die Zelllinien in der Konzentration 3xK2. Während fünf Linien ein weiteres Ansteigen ihres relativen Wachstums zeigen - am deutlichsten das Histiozytom 86/102 mit -5,3% auf 121% -, ist bei den fünf übrigen Linien ein Absinken ihrer Wachstumsaktivität zu beobachten.

In der höchsten Konzentration K3 sinkt in neun Fällen das relative Wachstum, wobei dies bei dem Schwannom 89/063 und dem Fibrosarkom 89/072 am auffälligsten ist. Die beiden Sarkome bleiben aber mit Werten von 513,7% bzw. 282,6% deutlich in dem Wachstumsbereich, in dem man von einem stimulativen Effekt der beiden Prostaglandine sprechen kann. Das Histiozytom 86/102 zeigt in der Konzentration K3 als einzige Linie ein Ansteigen des relativen Wachstums und erreicht mit 333,5% ihr Wachstumsmaximum.

3.3.3 Zusammenfassung

Unter der Einwirkung der Prostaglandinderivate ist kein eindeutiges Verhalten zu erkennen. Zu bemerken ist lediglich, dass diejenigen Zelllinien, die unter der Einwirkung von PGE1 einen stimulativen Effekt zeigen, diesen auch in den Versuchen mit PGI2 aufweisen.

Im Anhang befinden sich Grafiken, die einen direkten Vergleich der beiden Prostaglandine für jede Zelllinie ermöglichen.

4 Diskussion

4.1 ERYTHROPOIETIN

4.1.1 Proliferationstest

Der therapeutische Einsatz von rHuEPO, insbesondere bei Patienten mit einer tumorinduzierten Anämie (HERRMANN, 1991 und LUDWIG , 1990), bedarf der genauen Abklärung, ob es durch das Medikament zu einer Tumorzellstimulation kommen kann.

In den Versuchsreihen zur Proliferationstestung wurden die beiden Erythropoietine in physiologischen Konzentrationen eingesetzt, d.h. die Herstellerangaben für den in-vivo-Gebrauch wurden für den Einsatz in der Zellkultur umgerechnet (siehe MA-TERIAL und METHODEN). In diesen Konzentrationsbereichen konnte keine tumorzellstimulierende Wirkung auf die Sarkomzelllinien festgestellt werden.

Dieses Ergebnis wird von anderen Untersuchungen bestätigt (BAUER, 1992; BERDEL, 1991; FRIEDRICH, 1993b). Auch MUNDT stellte 1992 an verschiedenen Karzinomen keine veränderte Proliferation unter der Einwirkung von Erythropoietin fest. In den höheren Konzentrationsbereichen konnte eine Hemmung des Tumorzellwachstums beobachtet werden. Dieser inhibitorische Effekt scheint aber ohne therapeutische Relevanz zu sein, da die Konzentrationen hier weit über den angegebenen Therapiedosen liegen.

4.1.2 Zytotoxizitätstest

In diesen Versuchsreihen wurden die Sarkomzelllinien mit unphysiologisch hohen Konzentrationen Erythropoietin behandelt (siehe MATERIAL und METHODEN).

Auch hier wurden bei dem größten Teil der Sarkomzelllinien keine Hinweise für eine tumorzellstimulierende Aktivität gefunden. Lediglich in drei Fällen verstärkte sich das Wachstum dosisunabhängig (siehe ERGEBNISSE). Die gelegentlich auftretenden Unterschiede in der Wirkung von ERYPO und RECORMON könnten chargenabhängig sein. Zu beachten ist, daß in der höchsten Konzentrationsstufe alle Linien eine Minderung bzw. eine Inhibition ihres Wachstums zeigen. Dieser Effekt ist aber zu vernachlässigen, da die angewandten Dosen weit über den üblichen Therapiedosierungen liegen.

4.2 PROSTAGLANDINE

Das relative Zellwachstum wurde bei dem Großteil der untersuchten Sarkomzelllinien nicht oder nur im geringen Maße von den Prostaglandinderivaten beeinflusst. Erstaunlicherweise wurden zwei der Linien von beiden Prostaglandinen stimuliert (siehe MATERIAL und METHODEN; Friedrich, 1993a). Normalerweise würde kein proliferativer Effekt der Prostaglandine erwartet werden. Neben ihren antithrombotischen sind auch antimetastatische Eigenschaften dieser Substanzen bekannt (GASTPAR, 1982). Antimetastatische Eigenschaften einer Substanz sind keine Garantie für ähnliche Effekte in Bezug auf die Stimulation des Tumorzellwachstums. ELLIS et al. (1990) stellte eine differenzierte Rolle von Prostaglandin E₁ in der Tumormetastasierung des Lewis-Lungenkarzinoms der Nacktmaus dar. Auf der einen Seite wirkte

PGE1 als Promotor auf artifizielle Metastasen (i.v.-Infusion von Karzinomzellen während konstanter PGE1-Infusionen), während es antimetastatische Effekte bei Tieren mit primären LLK zeigte. Prostaglandin I2 wurde eine antimetastatische Aktivität auf Lebermetastasen eines humanen Pankreasadenokarzinoms der Nacktmaus zugeschrieben (SCHWALKE et al., 1990). Wegen ihrer Wechselwirkung zwischen antithrombotischer Eigenschaften und Tumorzellen zeigen PGE1 und PGI2 antimetastatische Effekte in anderen experimentellen Studien (COSTANTINI et al., 1988; GIRALDI et al., 1988). In einer experimentellen Studie wurden verschiedene Prostaglandine in ihrer Wirkung auf Synthese und Sekretion von Proteinen und Glykoproteinen untersucht. PGE2 und 16,16-dimethyl-PGE2 steigerten die Aufnahme von Aminosuktern in Zellkompartimente und die Ausscheidung säure unlösliche Makromoleküle konzentrationsabhängig. Auf der anderen Seite zeigte sich bei diesem Versuch, daß ILOPROST ineffektiv bei der Stimulation von Magenmukosazellen des Schweins ist (HEIM et al., 1990).

Prostaglandine (PGF2a, PGE1, PGE2),TxB2 und Plasmafettsäurenspiegel wurden durch Doxorubicin-Applikation bei Ratten bis zu neun Wochen nach Gabe nicht beeinflusst (ROBINSON und GIRI, 1987). Dies unterstützt die Hypothese, daß die endogene Prostaglandinproduktion in normalen Zellen während der Chemotherapie (Doxorubicin) kaum beeinflusst wird.

Bis jetzt sind die verfügbaren Daten in Bezug auf die Arzneimittelsicherheit von PGE1 und PGI2 im Hinblick auf eine mögliche Stimulation von Tumorzellwachstum beschränkt. Obwohl der klinische Erfolg der Mikrogefäßchirurgie möglicherweise durch den Einsatz antithrombotischer Substanzen entscheidend mitbeeinflusst

werden kann, ist doch ein patientenorientierter Test nötig, der die Frage klärt, ob eventuell ein individueller Stimulationseffekt vorliegt. Diese Fragestellung wäre ebenfalls zu klären, wenn es postoperativ zu einer verlängerten Anwendung dieser antiaggregatorischen Substanzen kommt.

4.3 ANDROGENE

Die Androgene zeigten bei allen Sarkomzelllinien eine auffällige Reaktion. Während es in den niedrigen und in den hohen Konzentrationsbereichen zu keiner bzw. einer nur geringen Änderung des Wachstumsverhaltens der Zelllinien kam (siehe 3.), ist in der mittleren Konzentration eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit zu beobachten. Dieses "zweiphasige" Verhalten wird durch mehrere Untersuchungen bestätigt. OLEA (1990) stellte bei der Untersuchung der androgen-sensitiven Prostatatumorzelllinie LNCaP mit Anti-Androgenen eine ähnliche biphasische Reaktion der Zelllinie fest, wobei die Übertragbarkeit der Ergebnisse natürlich beschränkt ist, da es sich hierbei um eine Karzinomzelllinie handelt.

SERRERO(1992) untersuchte die Wirkung von Testosteron auf Teratomzellen der Maus. In-vivo und in-vitro beobachtete sie eine Reduktion des Wachstums der Zellen bzw. der Zelllinien. Bei der Untersuchung von permanenten Plattenepithelkarzinomzelllinien des Larynx unter Testosteroneinfluß wies KLEEMANN (1993) eine dosisabhängige Wachstumshemmung nach.

Wachstumsregulierende Eigenschaften werden den Androgenrezeptoren in verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen. MATSUOKA (1987) wies einen stimulierenden Effekt von Androgenen auf Ösophaguskarzinome nach. In derselben Untersuchung wurde ein leichter inhibierender Effekt von

Östrogenen gezeigt. NEHSE (1994) stellte fest, daß unter Einwirkung von Androgenen der Gehalt von Androgenrezeptoren in Karzinomen der Mundhöhle und der Zunge signifikant geringer ist als der in normaler Mukosa.

Funktion und Aufbau der Androgen-Rezeptoren sind weitgehend bekannt (CHANG, 1988; LUBAHN, 1988; TILLEY, 1989). In der vorliegenden Untersuchung zeigen die Zelllinien eine Reaktion, die sich möglicherweise auf eine biphasische-konzentrationsabhängige Wechselwirkung zwischen Androgen und Androgen-Rezeptor zurückführen lassen. Ein ähnliches Ergebnis zeigt die Untersuchung von OLEA (1990).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten durch weitere Untersuchungen verifiziert werden, zumal die Daten in Bezug auf Sarkome beschränkt sind.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Untersuchung wurden im Monolayer-Proliferations-Assay verschiedene Substanzgruppen (Rekombinantes humanes Erythropoietin, Prostaglandinderivate und Androgene) in Bezug auf ihre Wirkung auf das Wachstumsverhalten von Tumorzelllinien mesenchymaler Herkunft getestet. Bei den angewendeten Substanzen handelt es sich um Stoffe, die sich in klinischer Anwendung befinden. Da sie hierbei oftmals bei Tumorpatienten verwendet werden, stellte sich die Frage, ob und in welchem Ausmaß ein proliferativer Effekt auf den Tumor zu erwarten ist.

Die Erythropoietine zeigten keinen proliferativen Einfluß auf die Tumorzelllinien, im höheren Konzentrationsbereich einen geringen inhibierenden Effekt, der aber ohne Relevanz zu sein scheint, da die Konzentrationen oberhalb der therapeutischen Bandbreite liegt. Unter Einwirkung der Prostaglandinderivate zeigten die Sarkomzelllinien individuelle Reaktionen. Während es bei den Rhabdomyosarkomen und den Liposarkomen zu einer Steigerung des relativen Wachstums bis auf das Doppelte kam, wurden ein Fibrosarkom und ein malignes Schwannom bis 500% bzw. 800% stimuliert.

Die Zelllinien reagierten bei der Behandlung mit Androgenen auffällig. Während es in den niedrigen Konzentrationsbereichen zu einem Absinken des relativen Wachstums kam, um in den mittleren Konzentrationen ein Minimum zu erreichen, stieg es in den höheren Bereichen wieder an. In der höchsten Konzentration kam es erneut zu einem Absinken des relativen Wachstums.

Zellkulturuntersuchungen mit Sarkomzelllinien sind selten; diese Arbeit sollte daher als Grundlage für weitergehende Untersuchungen in Bezug auf Sarkome gelten.

6 Literaturverzeichnis

Ammon HP (1987) *Androgene und Anabolika* in:

Forth W, Henschler D, Rummel W (Hrsg.) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

BI Wissenschaftsverlag Mannheim/Wien Zürich, 5., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage : 705-711

Arps H (1988) *Maligne humane Tumoren in der Zellkultur*. Habilitationsschrift, Universität Hamburg

Baldus M, Brass H (1992) *Erythropoietin- ein neues Prinzip in der Behandlung der renalen Anämie* in: Brass H, Scigalla P, Baldus M (Hrsg.) Erythropoietin Therapie. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen : 19-33

Bauer E, Danhauser-Riedl S, De Riese W, Raab H, Sandner S, Meyer HJ, Neukam D, Hanauske U, Freund M, Poliwoda H, Rastetter J, Hanauske A (1992) *Effects of recombinant human erythropoietin on clonogenic growth of primary human tumor specimens in vitro*. Onkologie 15: 254-258

Beebe S, Ewing J (1910) *A study of the biology of tumor cells*. Brit Med J 2: 1559

Berdel W, Oberberg D, Reufi B, Thiel E (1991) *Studies on the role of recombinant human erythropoietin in the growth regulation of human nonhematopoietic tumor cells in vitro*. Ann Hematol 63: 5-8

Bousser M, Lecrubier C (1972/73) *Effect of Prostaglandin E₁ on experimental thrombosis and platelet aggregation in rabbits.*
Haemostasis I: 294

Chang C, Kokontis J, Liao S (1988) *Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors.*
Proc Natl Acad Sci USA 85: 7211

Clark S, Kamen R (1987) *The human hematopoietic Colony-stimulating factors.*
Science 236: 1229

Costantini V, Fuschiottii P, Allegrucci M, Agnelli G, Nenci G, Fioretti M (1988) *Platelet tumor cell interaction: effect of prostacyclin and a synthetic analogon on metastasis formation.*
Cancer Chemother Pharmacol 22: 289-293

Dietel M, Arps H, Gerding D, Trapp M, Niendorf A (1987) *Establishment of Primary Cell Cultures: Experiences with 155 Cell Strains.*
Klin Wochenschr 65: 507-512

Ellis L, Copeland E, Bland K, Sitren H (1990) *Differential role of prostaglandin E₁ on tumor metastases.*
J Surg Res 48: 333-336

Egrie JC, Strickland TW, Lane J, Aoki K, Cohen AM, Smalling R, Trail G, Lin FK, Browne JK, Hines DK (1986) *Characterization and Biological Effects of Recombinant Human Erythropoietin.*

Immunobiol. 172: 213-224

Facon T, Walter M, Fenaux P, Morel P, Dupriez B, Gardin C, Jouet J, Bauters F (1991) *Treatment of severe aplastic anemia with antilymphocyte globulin and androgens: a report on 33 patients.*

Ann Hematol 63: 89-93

Friedrich RE, Mestmacher P, Hellner D, Schmelzle R

(1993a) *Influence of PGE₁ and PGE₂ on the in vitro growth of human sarcoma cell lines.*

Program/proceedings EORTC early drug development meeting June 23-26 1993, Rotterdam/ ed. J Verweij.

Rotterdam Cancer Inst: 75

Friedrich RE, Mestmacher P, Hellner D, Arps H, Schmelzle R

(1993b) *Lack of tumor stimulating activity of human recombinant Erythropoietin (r-hu-EPO) on sarcoma cell lines in vitro.*

J Tumor Marker Oncology: Program and Abstracts/ 10th international conference on human tumor markers, Sep 8-11, 1993, Bonn: 99

Friedrich RE, Arps H (1994) *Zur Wirkung von humanem rekombinanten Erythropoietin auf solide maligne Tumoren in vitro.*

Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir 18: 40-41

Gastpar H (1982) *Die Beeinflussung der Metastasierung durch Gerinnungsmechanismen.* In: Schmähl, D. (Hrsg.) Krebsmetastasen, Thieme Stuttgart: 118-128

Giraldi T, Sava G, Perissin L, Zorzet S, Piccini P, Rapozzi V (1988) *Antimetastatic activity of the prostacyclin analog iloprost in the mouse.*
Pharmacol Res Commun 20: 182

Gruß JD, Vargas-Montano H, Bartels D, Simmenroth HW, Sakurai T, Schäfer G, Fietze-Fischer B (1984) *Use of Prostaglandins in Arterial Occlusive Diseases.*
Inter Angio 3: 7

Hackenberg R, Hofmann J, Wolff G, Hölzel F, Schulz KD (1990) *Down-regulation of androgen receptor by progestins and interference with estrogenic or androgenic stimulation of mammary carcinoma cell growth.*
J Cancer Res Clin Oncol 116: 492-498

Heidrich H, Ranft J, Peters A, Rummel S (1988) *Intravenöse PROSTAVASIN-Therapie bei peripher-arteriellen Durchblutungsstörungen im Fontaine-Stadium III und IV. Früh- und Spätergebnisse einer Screening-Studie* in: Heidrich H, Böhme H, Rogatti W (Hrsg.) Prostaglandin E1- Wirkungen und therapeutische Wirksamkeit. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: 112-117

Heim H, Oestmann A, Sewing K (1990) *Stimulation of glycoprotein and protein synthesis in isolated pig gastric mucosal cells by prostaglandins.*

Gut 31: 412-416

Herrmann F, Oster W, Mertelsmann R (1991) *Treatment of Patients with Anemia of Malignancy with Recombinant Human Erythropoietin* in: Gurland HJ, Moran J, Samtleben W, Scigalla P, Wiecezorek L (Hrsg.) *Erythropoietin in Renal and Non-Renal Anemias.*

Contrib Nephrol. Basel, Karger 88: 238-245

Kleemann D (1993) *Testosteron- versus Dihydrotestosteron-Effekte auf permanente Plattenepithelkarzinomzellen des Larynx.*

Laryngo-Rhino-Otol 72: 402-405

Kojima S, Miyajima Y, Fukuda M, Matsuyama T, Maeda H, Yamamoto K, Tsusuki S, Akatsuka M, Sugihara T, Minami S et al. (1992) *Treatment of aplastic anemia with antilymphocyte globulin, high-dose methylprednisolone and androgen.* Rinsho-Ketsueki 33: 11-16

Krause W (1985) *Männliches Hormonsystem* in:

Kümmerle Klinische Pharmakologie.

4.Auflage, 2.Erg.Lfg.

Lin FK, Lin CH, Browne J, Smalling R, Egrie J, Chen K, Fox G, Martin F, Stabinsky Z, Brdrawi S, Lai PH, Goldwasser E

(1985) *Cloning and expression of the human erythropoietin*. Proc natl Acad Sci USA 82: 7580-7584

Löffler G, Weiss L (1988) *Intermediärstoffwechsel III: Lipide* in: Löffler G, Petrides P Physiologische Chemie. 4., überarbeitete und erweiterte Auflage. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York : 392-441

Lubahn DB, Joseph DR, Sar M, Tan J, Higgs HN, Larson RE, French FS, Wilson EM (1988) *The human androgen receptors: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis, and gene expression in prostate*. Mol Endocrinol 2: 1265

Ludwig H, Fritz E, Kotzmann H, Gisslinger H (1990) *Erythropoietin-Behandlung der tumorassoziierten Anämie bei Patienten mit multiplem Myelom*. Onkologie 13: 46-49

Matsuoka H, Sugimachi K, Ueo H, Kuwano H, Nakano S, Nakayama M (1987) *Sex hormone response of a newly established squamous cell line derived from clinical esophageal carcinoma*. Cancer Res. 47: 4134-4140

Miller CB (1991) *Chemotherapy-Induced Anemia* in: Gurland HJ, Moran J, Samtleben W, Scigalla P, Wieczorek L (Hrsg.) Erythropoietin in Renal and Non-Renal Anemias. Contrib Nephrol. Basel, Karger 88: 248-251

Mundt D, Berger MR, Bode G (1992) *Effect of Recombinant Human Erythropoietin on the Growth of Human Tumor Cell Lines in vitro.*

Drug Res 42: 92-95

Nehse G, Tunn S (1994) *Androgen and progesteron receptors in oral carcinoma.*

J Cranio-maxillo-facial Surgery 22: 114-119

Nishi M, Tashiro M, Yoshida H (1992) *Stimulation of growth by both androgen and estrogen of the EMP-K1 transplantable tumor with androgen and estrogen rezeptors from human extramammary Paget`s disease in nude mice.*

J Natl Cancer Inst 84: 519-523

Olea N, Sakabe K, Soto A, Sonnenschein C (1990) *The Proliferative Effect of "Anti-Androgens" on the Androgen- Sensitive Human Prostate Tumor Cell Line LNCaP.*

Endocrinol 3: 1457-1463

Oster W, Schindel F, Heinrichs H (1991) *Clinical Evaluation of Erythropoietin (EPO) in Oncology.*

Behring Inst. Mitt. 90: 62-68

Platanias LC, Miller CB, Mick R, Hart RD, Ozer H, McEvilly JM, Jones RJ, Ratain MJ (1991) *Treatment of Chemotherapy-Induced Anemia with Recombinant Human Erythropoietin in Cancer Patients.*

J Clin Oncol 9: 2021-2026

Robinson T, Giri S (1987) *Effects of chronic administration of doxorubicin on plasma levels of prostaglandins, thromboxane B₂ and fatty acids in rats.*

Cancer Chemother Pharmacol 19: 213-220

Schaefer RM , Heidland A (1992) *Erfolgreicher Einsatz von rekombinanten humanem Erythropoietin bei der Behandlung der renalen Anämie* in: Brass H, Scigalla P, Baldus M (Hrsg.)

Erythropoietin Therapie. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen: 11-18

Schwalke M, Tzanakakis G, Vezeridis M (1990) *Effects of prostacyclin on hepatic metastases from human pancreatic cancer in the nude mouse.*

J Surg Res 49: 164-167

Scigalla P, Ehmer B, Woll EM, Wieczorek L (1992) *Zur individuellen Ansprechbarkeit terminal niereninsuffizienter Patienten auf die rh-EPO-Therapie* in: Brass H, Scigalla P, Baldus M (Hrsg.)

Erythropoietin Therapie. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen: 35-46

Serrero G, Lepak N, Hayashi J, Eisinger D (1992) *Effect of Testosterone on the Growth Properties and on the Epidermal Growth Factor Receptor Expression in the Teratoma-derived Tumorigenic Cell Line 1246-3A.*

Cancer Res 52: 4242-4247

Tilley WD, Marcelli M, Wilson JD, McPhaul MJ (1989) *Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor.*

Proc Natl Acad Sci USA 86: 327

Weber JP, Walsh PC, Peters CA, Spivak JL (1991) *Effect of Reversible Androgen Deprivation on Hemoglobin and Serum Immunoreactive Erythropoietin in Men.*

Am J Hematol 36: 190-194

Wellhöner HH (1988) *Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie.* 4., neubearbeitete Auflage. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

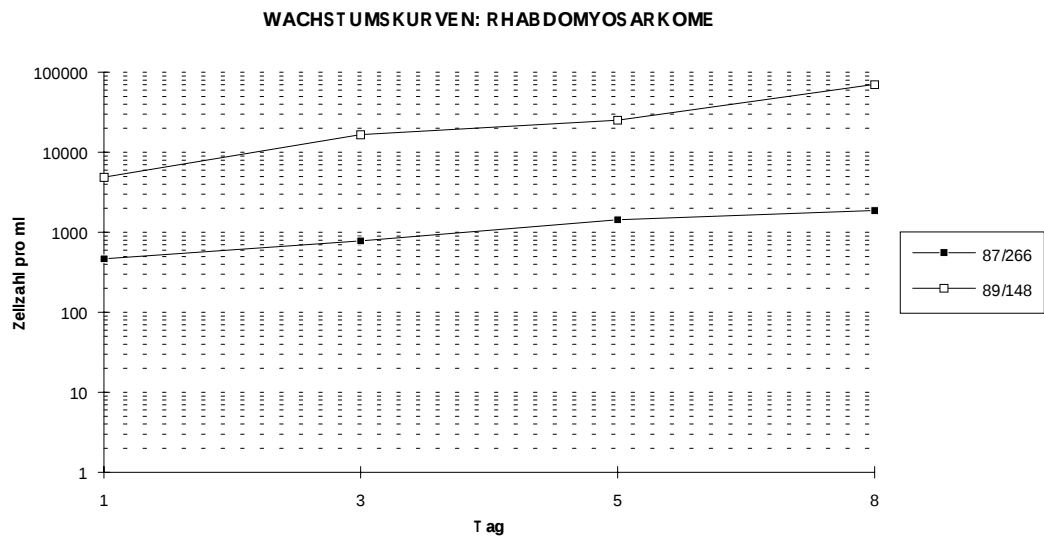
Zimmermann R, Stadler J, Harenberg J, Kübler W

(1988) *Zur antithrombotischen Wirkung von PGE₁ auf die experimentelle Thrombenbildung* in: Heidrich H, Böhme H, Rogatti W (Hrsg.) Prostaglandin E₁ Wirkungen und therapeutische Wirksamkeit. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York: 83-86

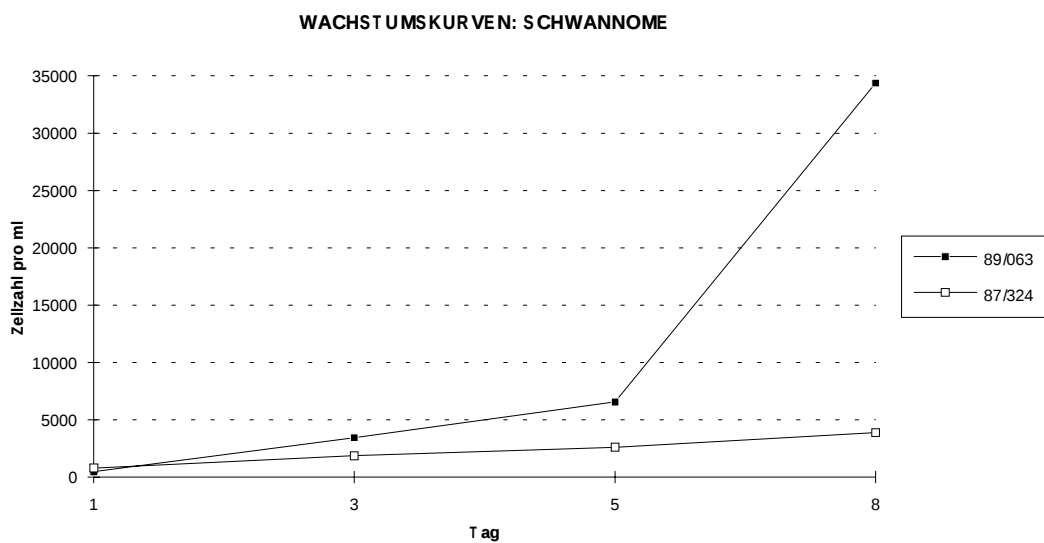
7 Anhang

1. Wachstumskurven

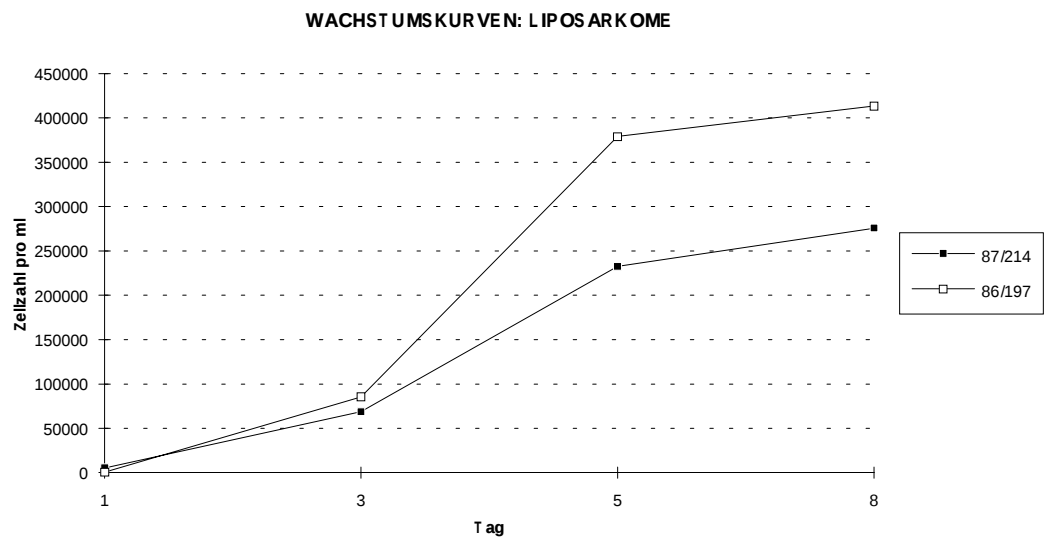
a. Rhabdomyosarkome



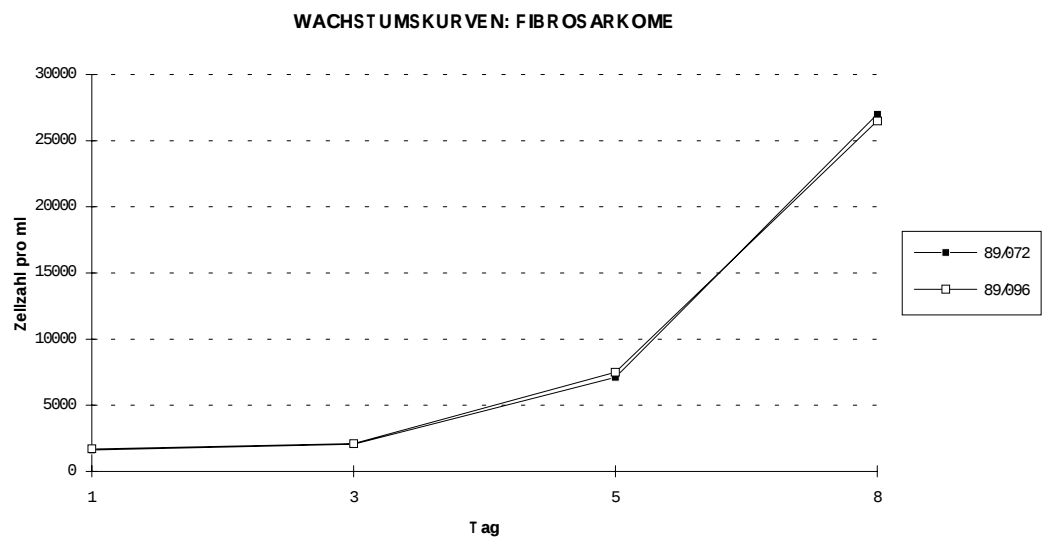
b. Schwannome



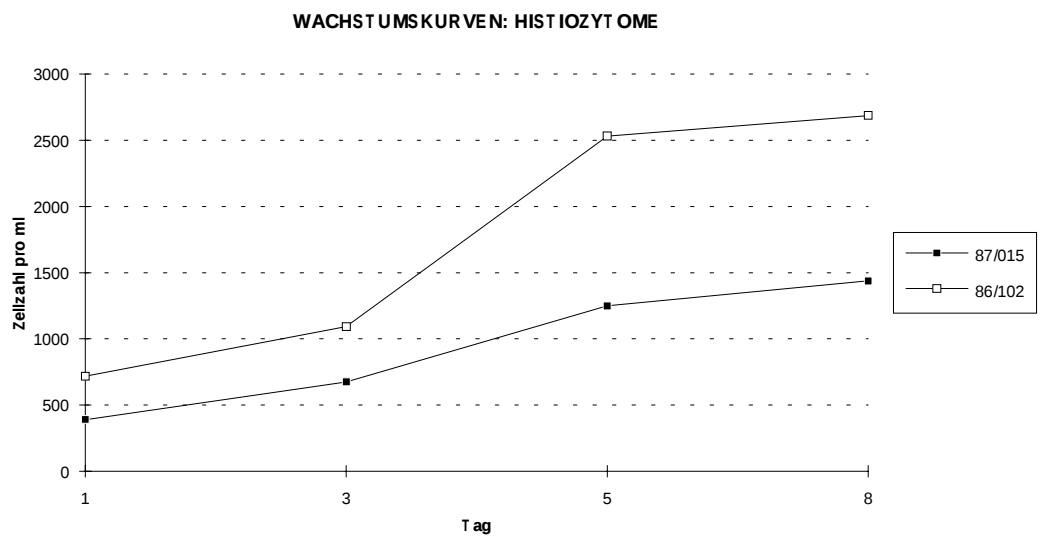
c.Liposarkome



d.Fibrosarkome

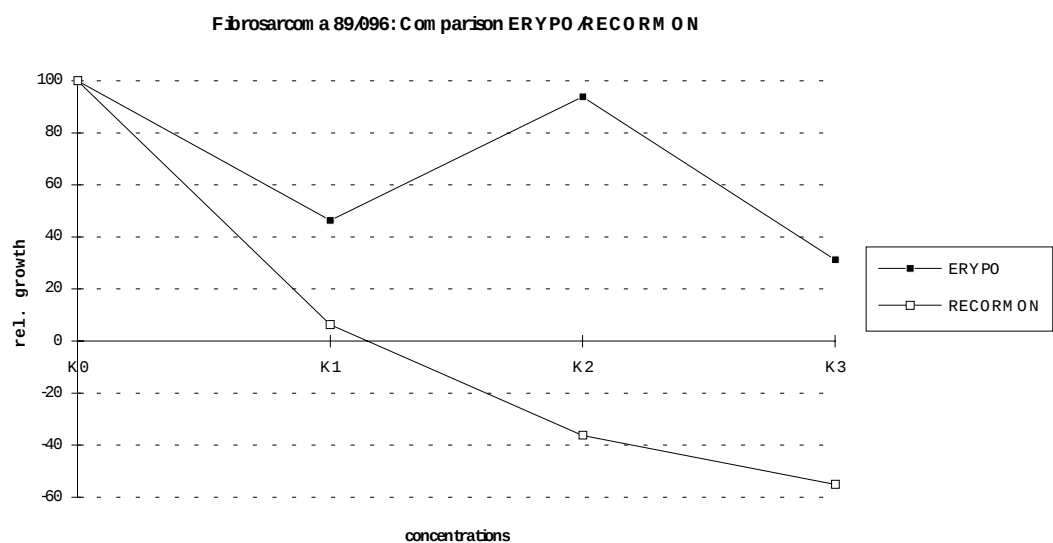


e.Histiozytome

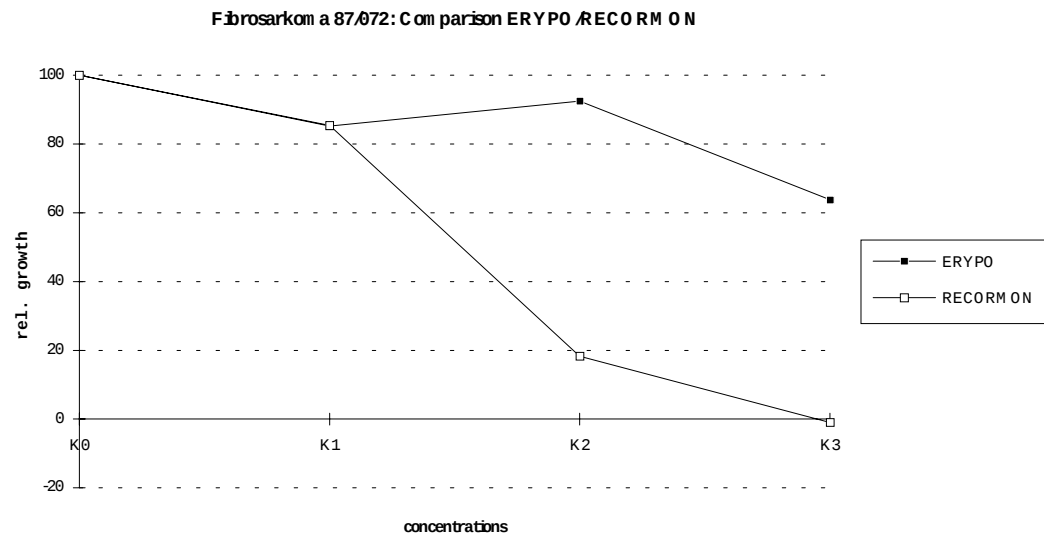


2.Erythropoietine: Vergleich ERYPO/RECORMON (Prolif.)

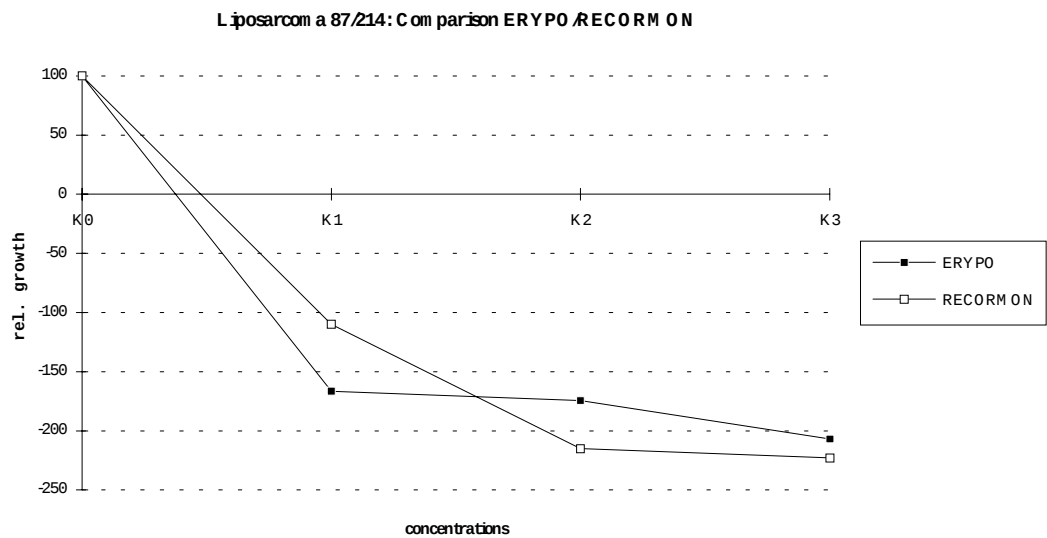
a.Fibrosarkom 89/096



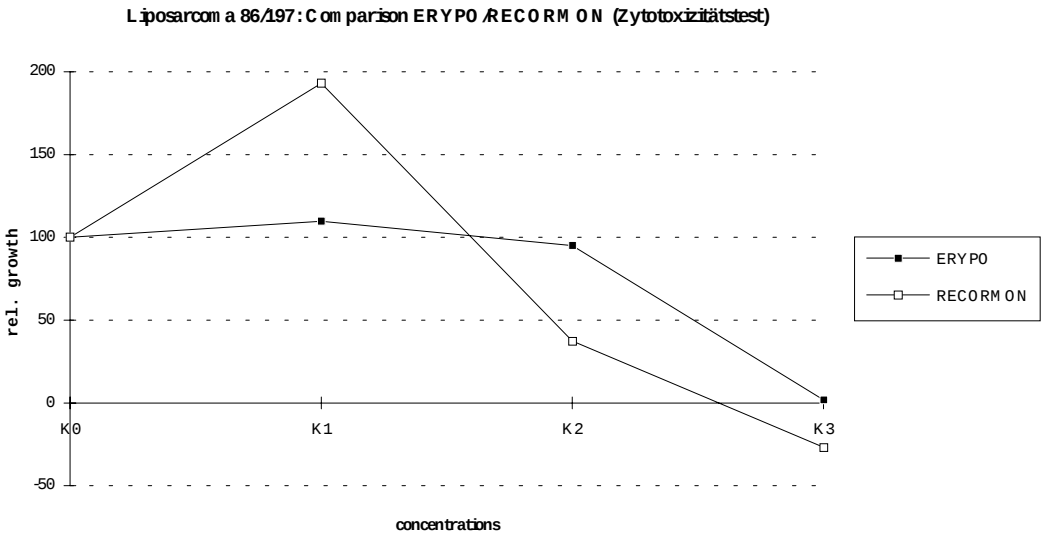
b.Fibrosarkom 87/072



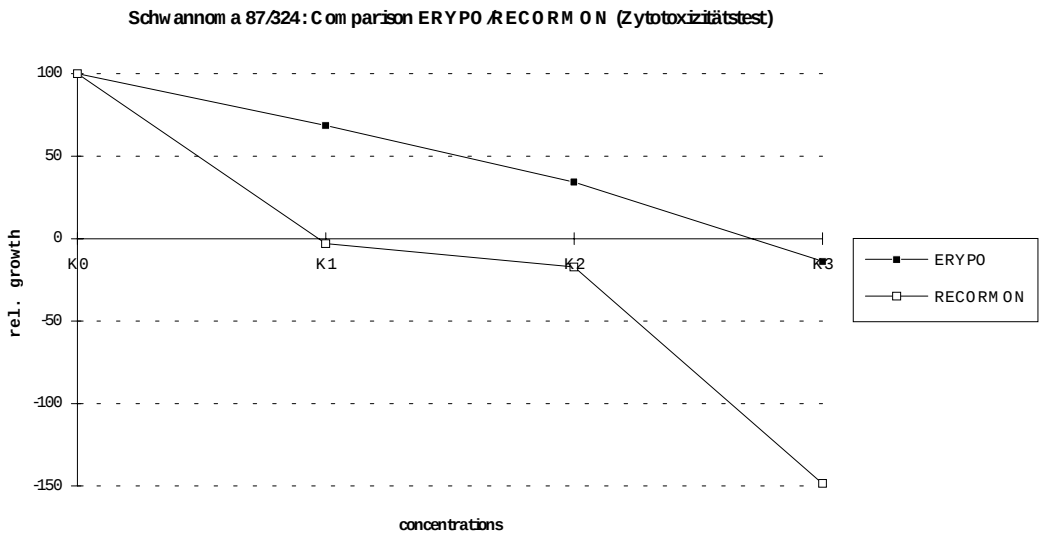
c.Liposarkom 87/214



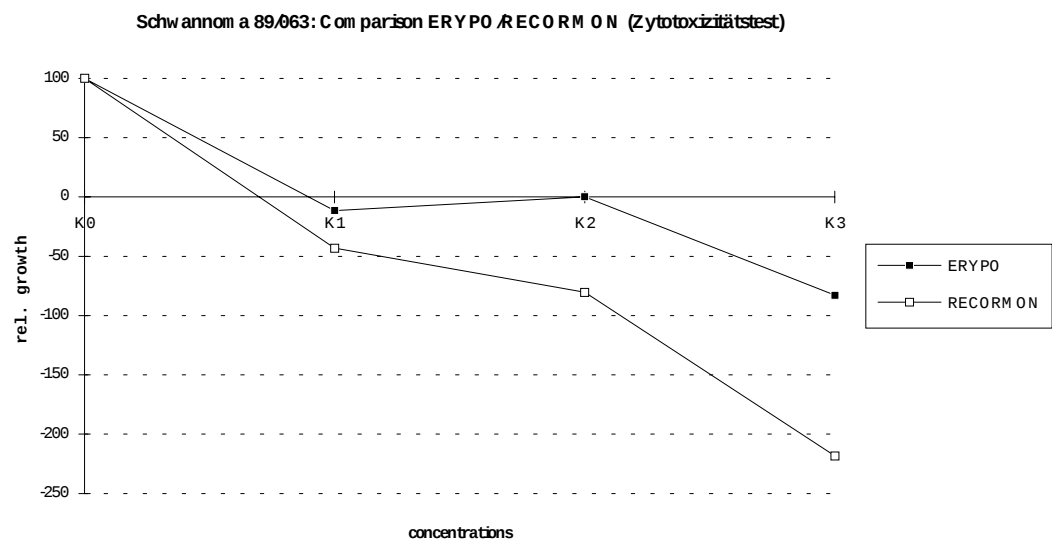
d.Liposarkom 86/197



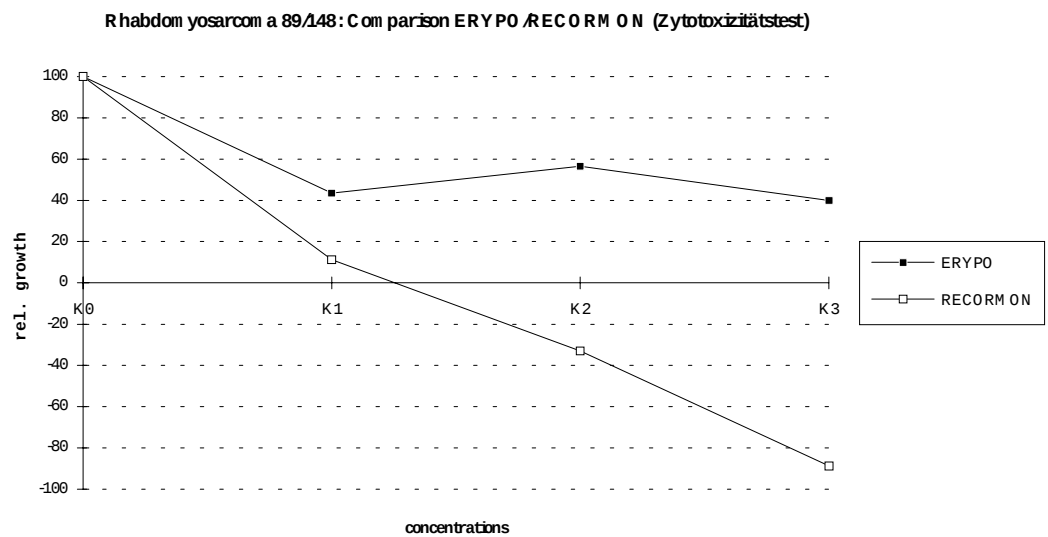
e.Schwannom 87/324



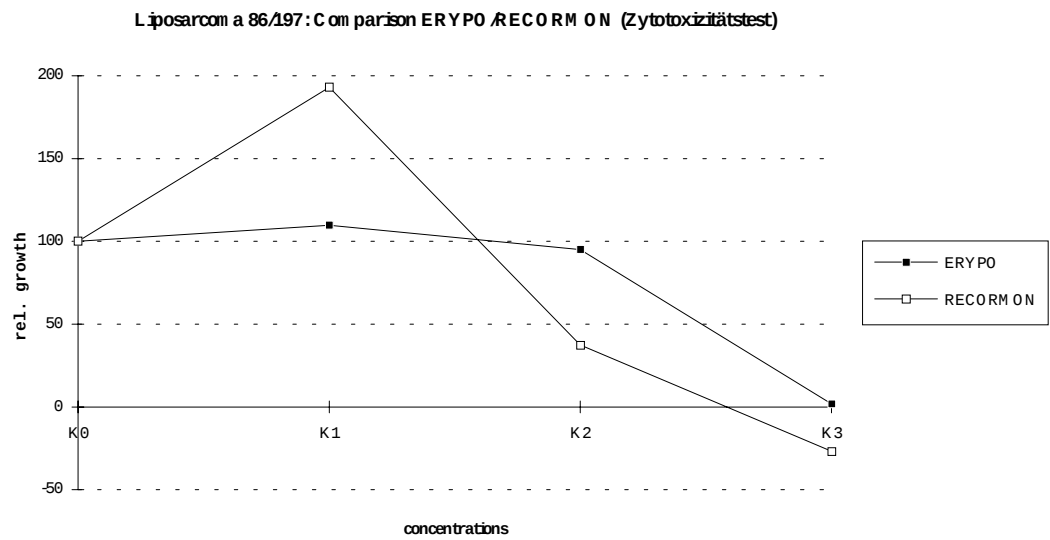
f. Schwannom 89/063



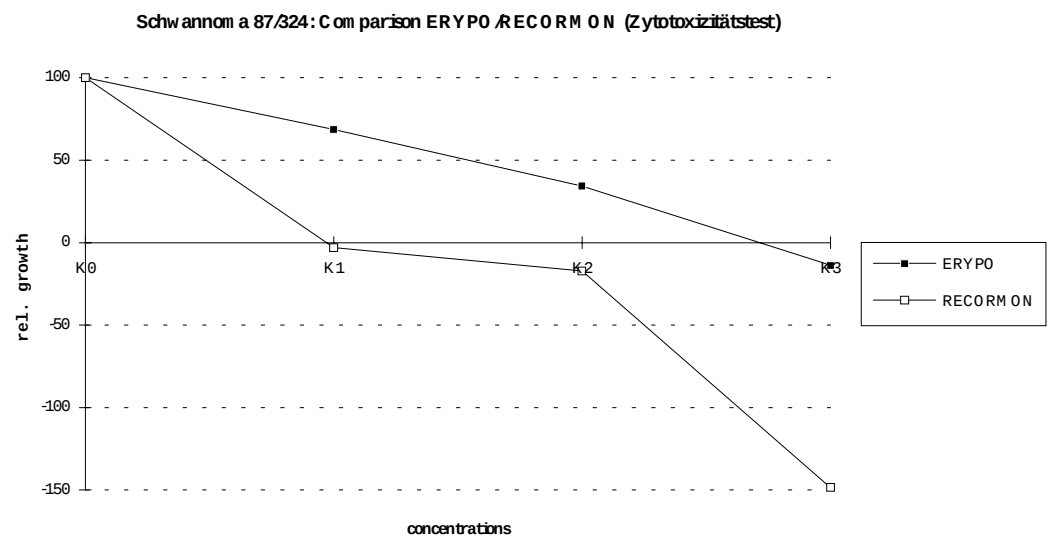
g. Rhabdomyosarkom 89/148



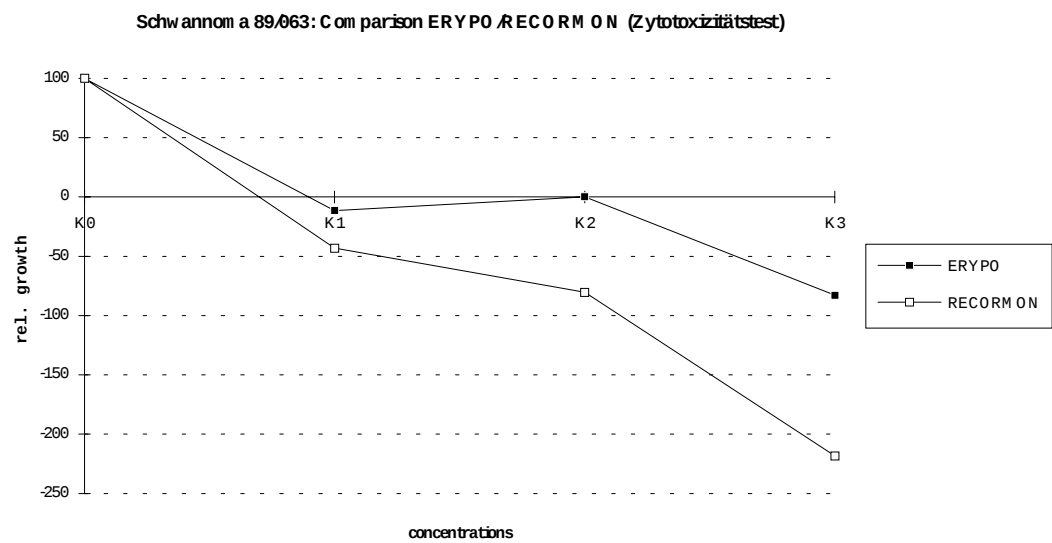
d.Liposarkom 86/197



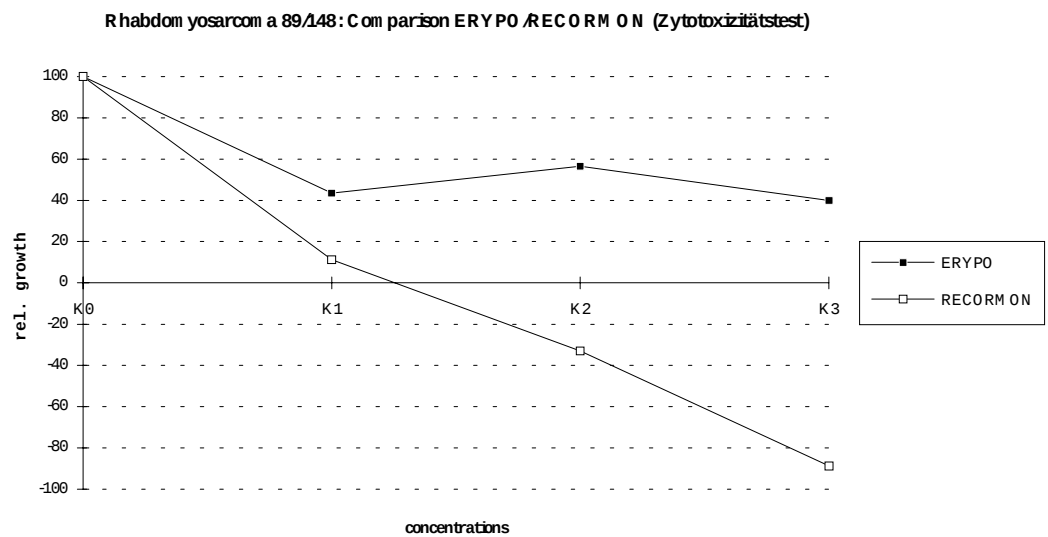
e.Schwannom 87/324



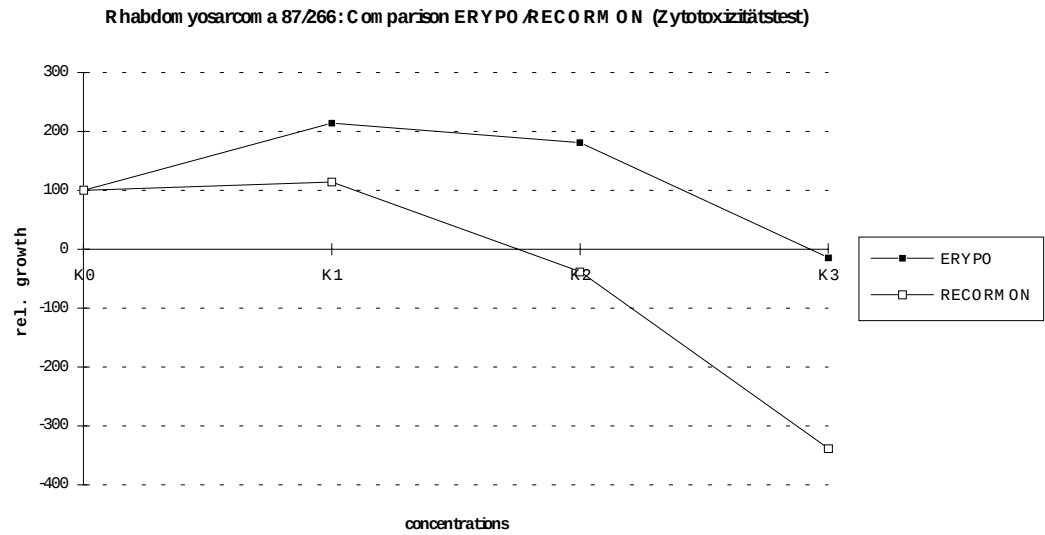
f. Schwannom 89/063



g. Rhabdomyosarkom 89/148

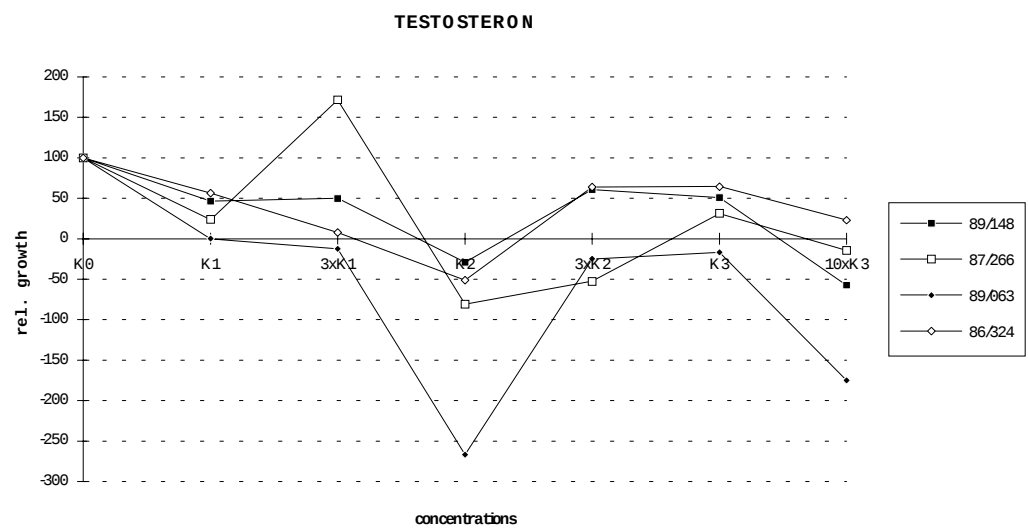


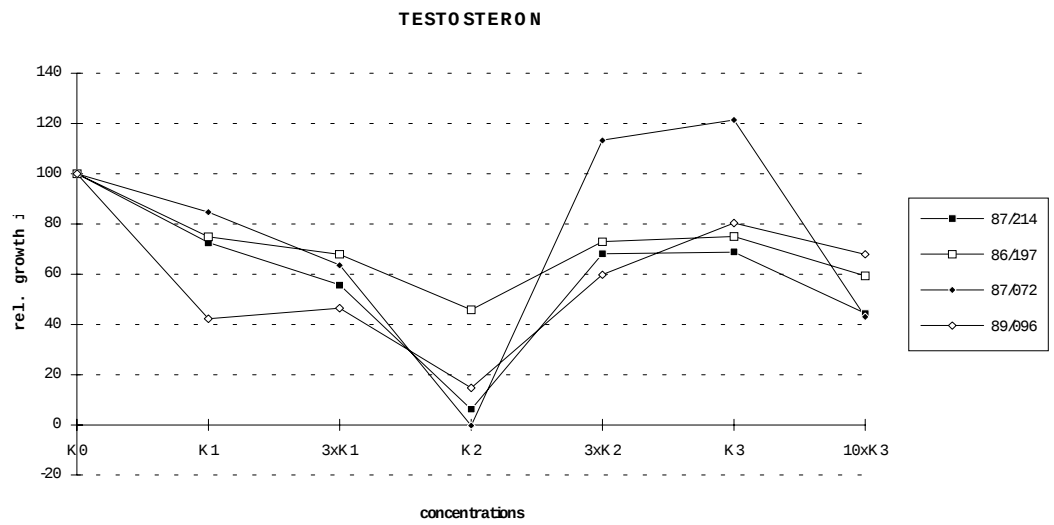
h.Rhabdomyosarkom 87/266



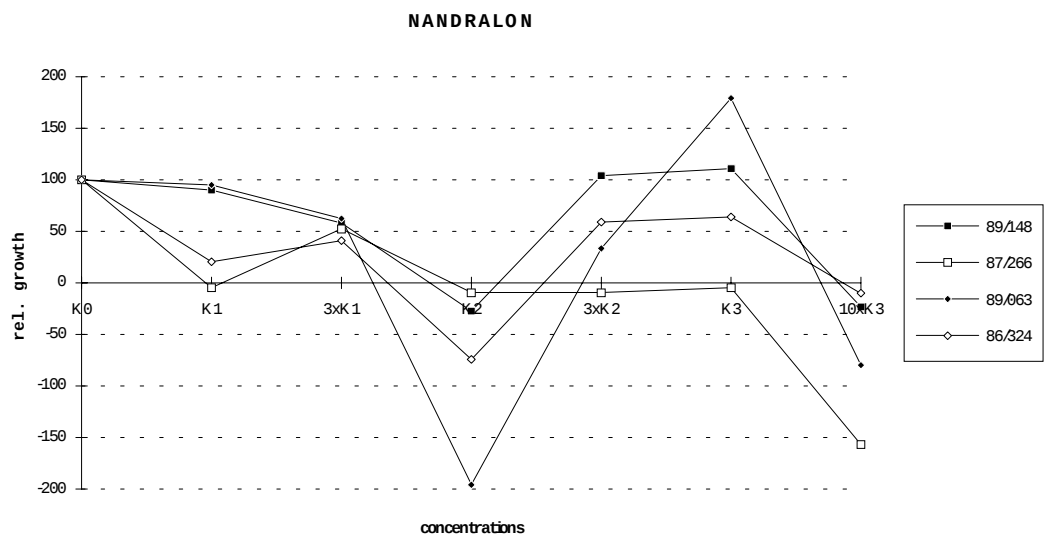
3.Androgene:Substanzvergleich

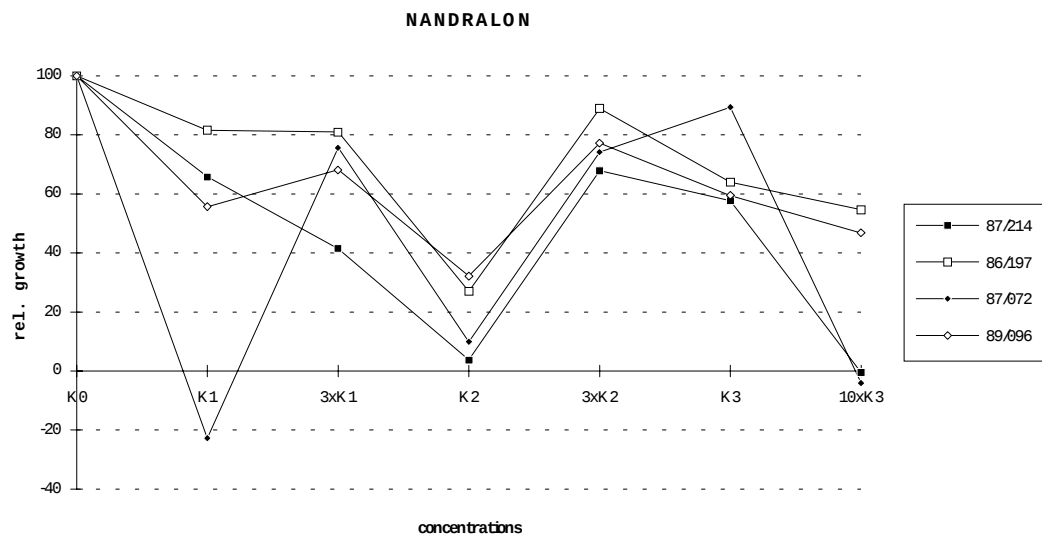
a.Testosteron



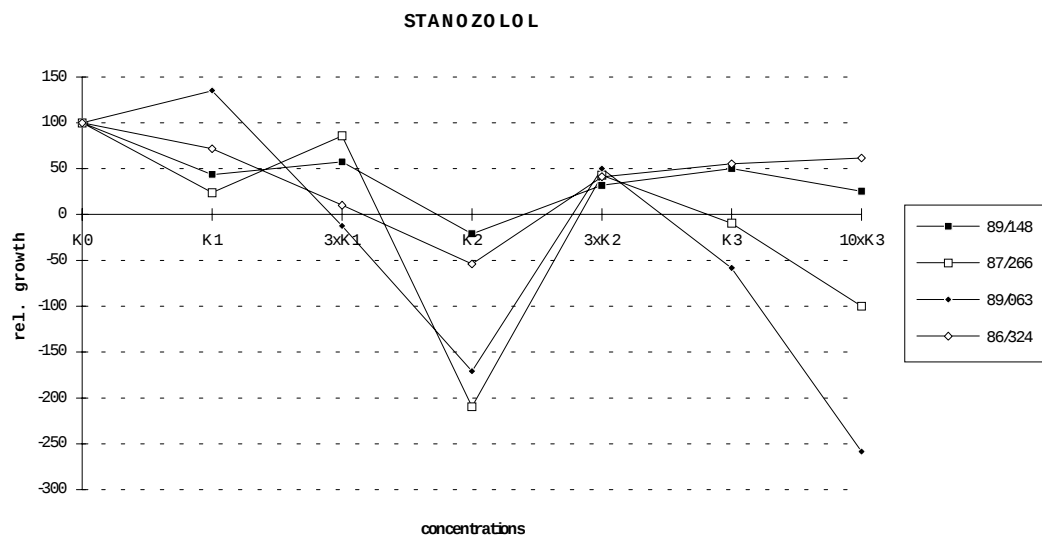


b.Nandralon





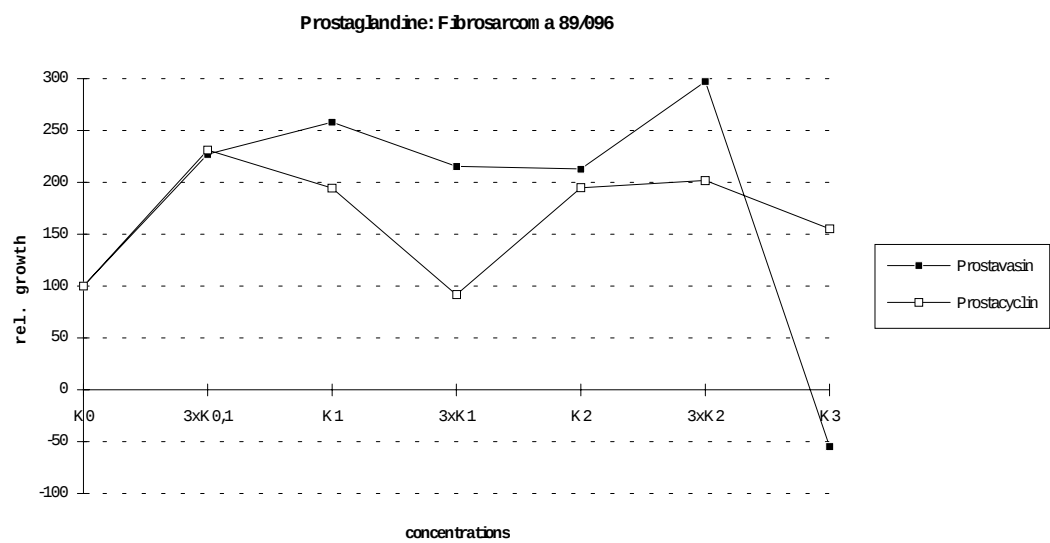
c.Stanozolol



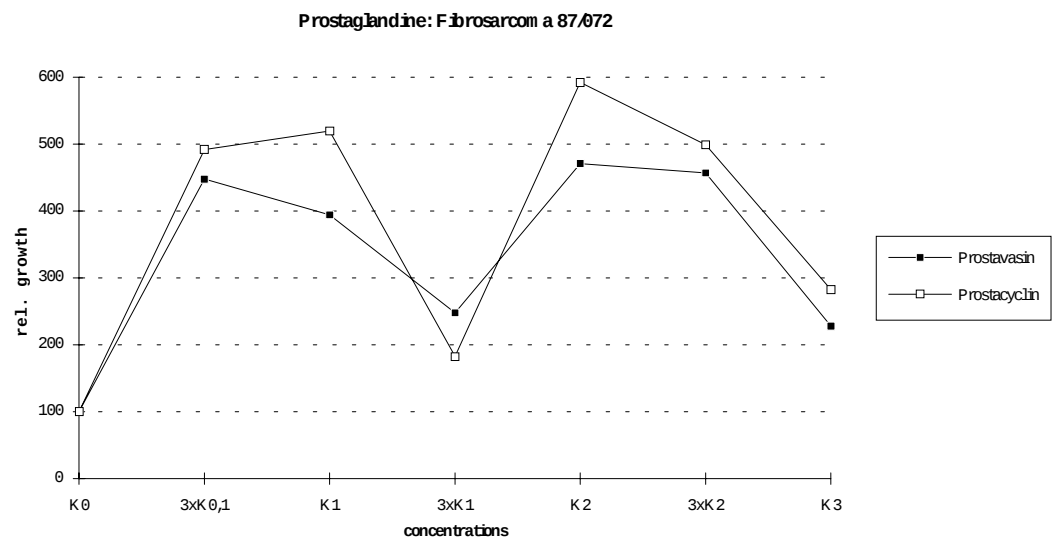


4. Prostaglandine

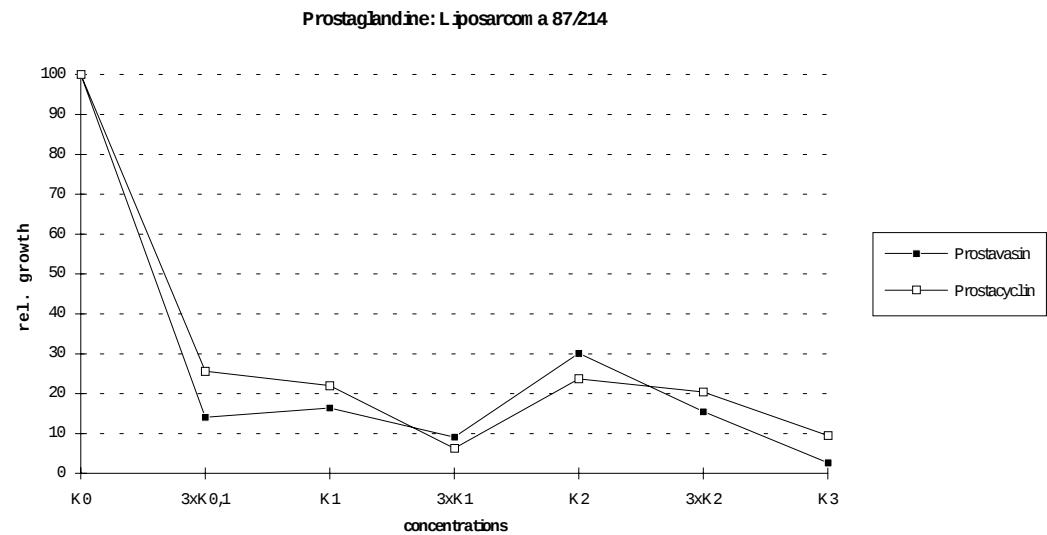
a. Fibrosarkom 89/096



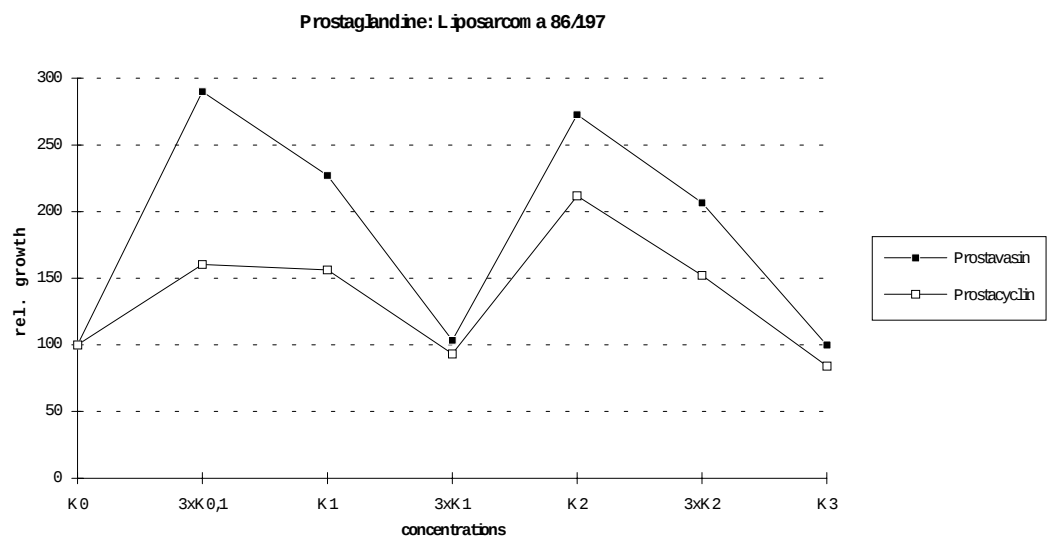
b.Fibrosarkom 87/072



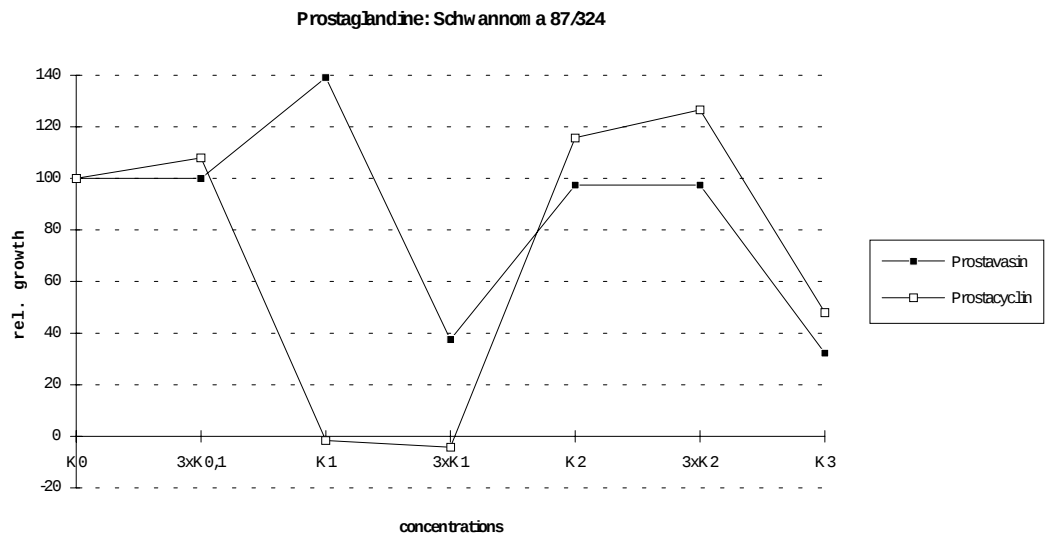
c.Liposarkom 87/214



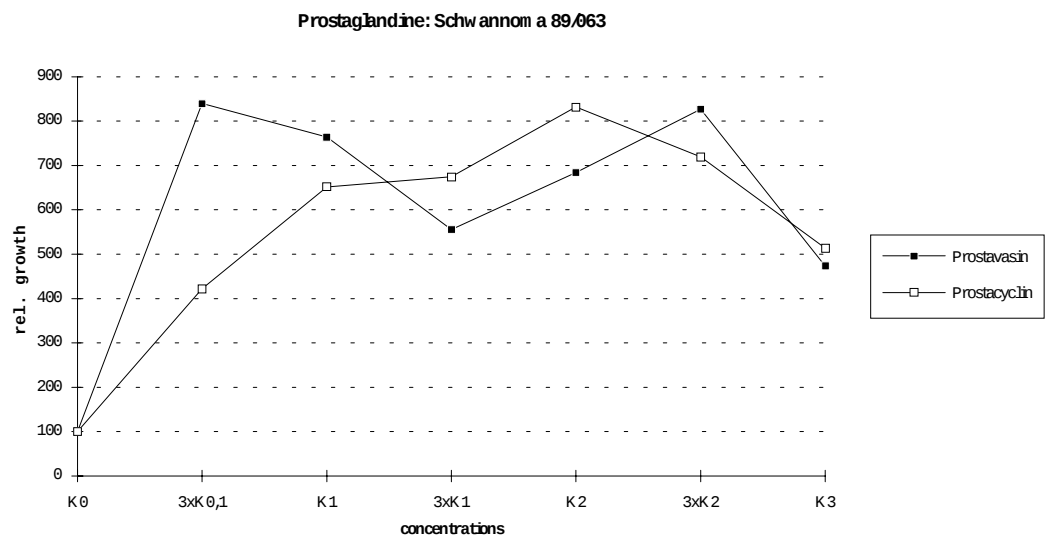
d.Liposarkom 86/197



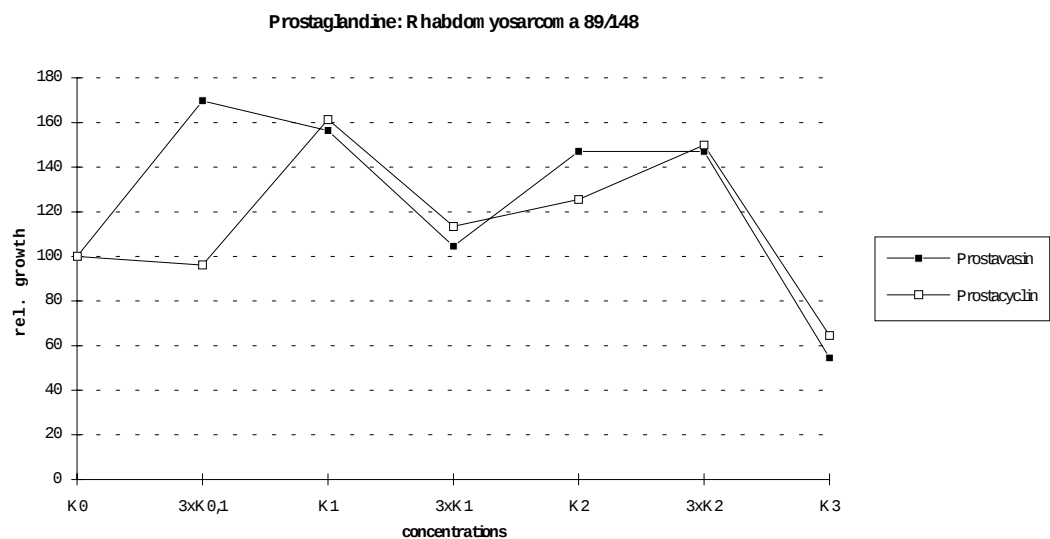
e.Schwannom 87/324



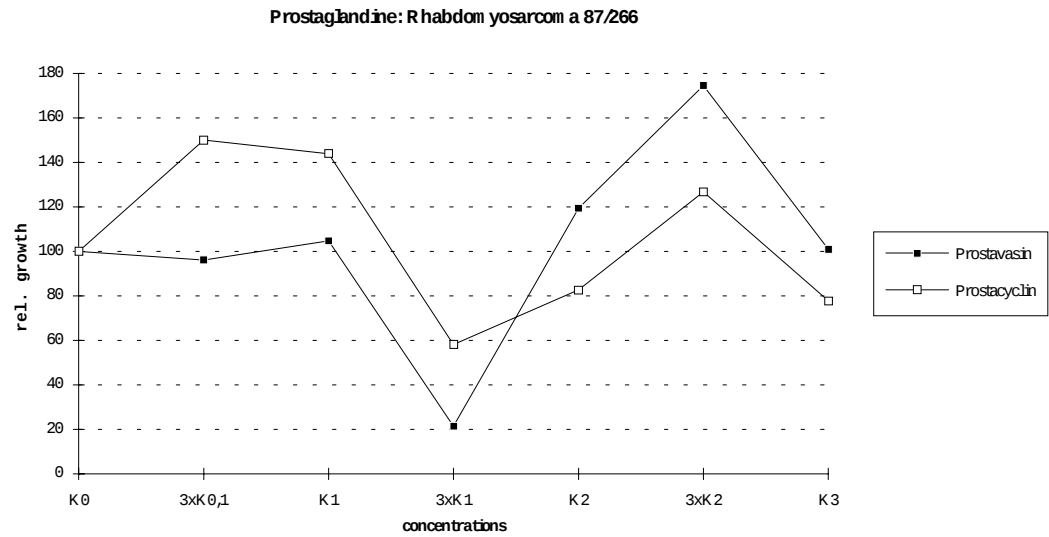
f.Schwannom 89/063



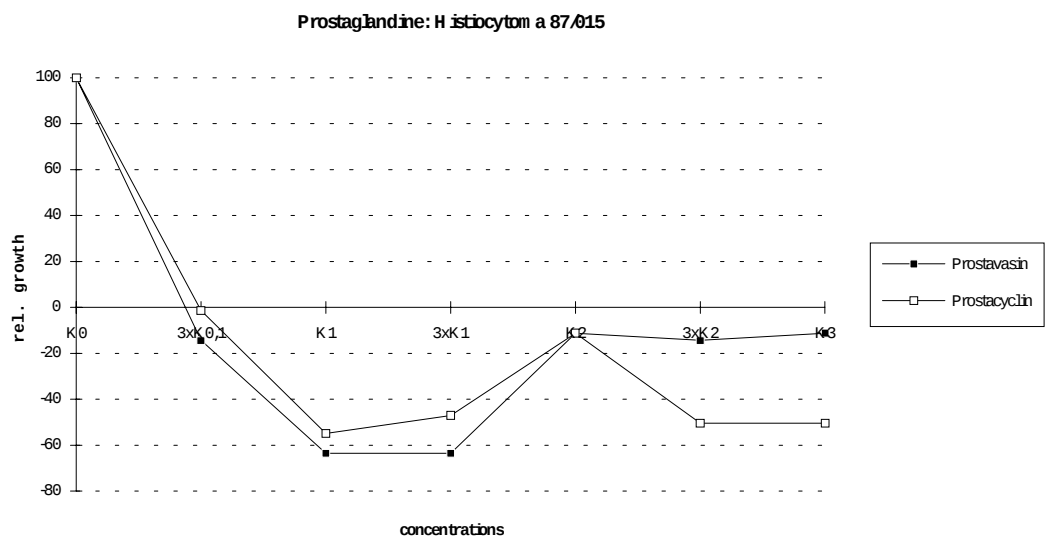
g.Rhabdomyosarkom 89/148

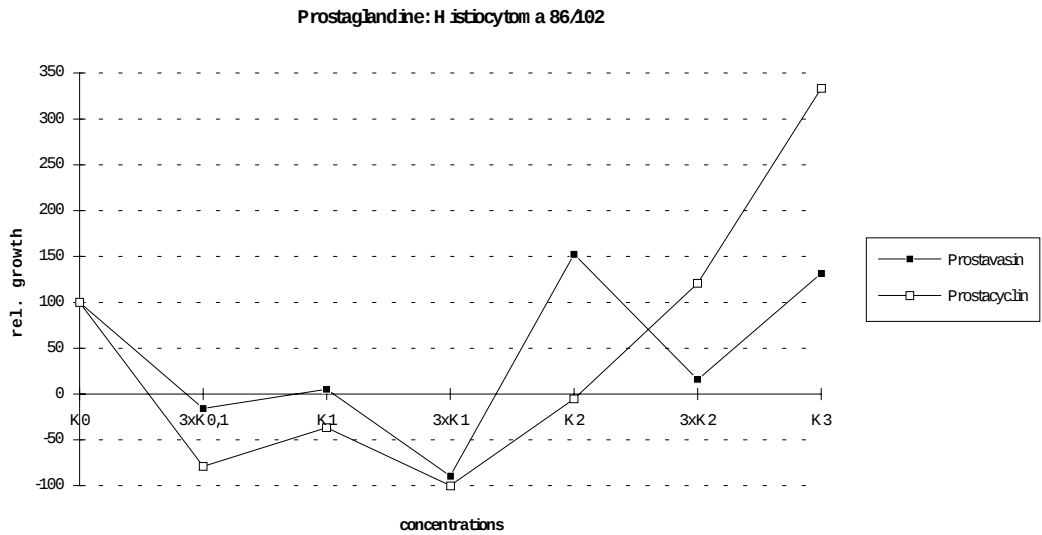


h.Rhabdomyosarkom 87/266



i.Histiozytom 87/015





8 Danksagung

Mein Dank gilt:

- Prof. Dr. Hartmut Arps für algebraische und technische Hilfestellung, dafür, das Zellkulturlaboratorium und die Zelllinien zur Verfügung gestellt zu haben sowie für die Anleitung zum Arbeiten mit Zellkulturen und die Einführung in den Monolayer-Proliferationsassay
- Dr. Dr. Reinhard E. Friedrich für die Themenstellung, die langjährige Unterstützung, Anregung und konstruktive Kritik
- Prof. Dr. Dr. Rainer Schmelzle für die Möglichkeit, diese Arbeit zu erstellen
- Frau Sandra Schmidt für die tatkräftige Unterstützung im Labor
- Dr. Andreas Reimann für die Hilfe in pharmakologischen Fragen

und

meinen Eltern

9 Lebenslauf

Name: Peter Mestmacher

Geburtsdatum: 9.3.1963

Geburtsort: Uelzen

Eltern: Peter Mestmacher, geb. 2.10.1936
Beruf: Polizeibeamter
Erika Mestmacher, geb. 6.1.1942
Beruf: Kinderkrankenschwester

Geschwister: Bernd Mestmacher, geb. 5.8.1966

schulischer Werdegang:
Grundschule 1969-1973 in Kiel
Gymnasium 1973-1982 in Kiel
Abitur 1982

1982-1983 Grundwehrdienst
1983-1985 Studium Maschinenbau und
Geophysik
1985-1986 Zivildienst
1986-1989 Tätigkeit als Krankenpfleger

Studium Zahnmedizin:
Beginn Sommersemester 1989
Vorphysikum 2.10.1990
Physikum 11.10.1991
Staatsexamen Sommersemester 1994
Approbation 2.Feb.1995
seit dem 8.Feb.1995 Zahnarzt in freier
Praxis

10 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt habe oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
